

**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)**

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

***LUIS FERNANDO LÓPEZ TORT***

**EPIDEMIOLOGÍA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE  
VIRUS ENTÉRICOS DETECTADOS EN NIÑOS  
HOSPITALIZADOS Y AGUAS RESIDUALES DE  
URUGUAY**

Tesis defendida de forma oral y pública en el Centro Universitario Salto (CUS) (CENUR Litoral Norte, UDELAR) dentro del Área Biología del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República (UDELAR) como parte de los requisitos para la obtención del título de doctor en Ciencias Biológicas. Sub-área: Biología Celular y Molecular.

**Director:** Dr. Rodney Colina – Centro Universitario Salto, CENUR Litoral Norte.

**Co-directores:** Dr. Juan Cristina – Facultad de Ciencias, UDELAR

Dr. Jose Paulo Gagliardi Leite – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

**Diciembre de 2015, Salto, Uruguay**

**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)**

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

***LUIS FERNANDO LÓPEZ TORT***

**EPIDEMIOLOGÍA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE  
VIRUS ENTÉRICOS DETECTADOS EN NIÑOS  
HOSPITALIZADOS Y AGUAS RESIDUALES DE  
URUGUAY**

**Director:** Dr. Rodney Colina – Centro Universitario Salto, CENUR Litoral Norte.

**Co-directores:** Dr. Juan Cristina – Facultad de Ciencias, UDELAR

Dr. Jose Paulo Gagliardi Leite – Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

**Aprobada el 14/12/2015**

**Tribunal:**

Dr. Juan Arbiza (*Presidente*) – Facultad de Ciencias, UDELAR.

Dr. Alejandro Castello (*vocal*) – Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Dr. Fernando Spilki (*vocal*) – Universidad de Feevale, NV o Hamburgo, Brasil.

**Diciembre de 2015, Salto, Uruguay**

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a:

- En primera instancia, la educación pública uruguaya, que me permitió alcanzar este nivel de formación en ciencias, desde la escuela hasta la universidad. En especial agradezco a la actual campaña de descentralización y regionalización de la UDELAR. Gracias a ella no solo pude retornar a mi país, trabajar y formarme a nivel de doctorado en aquello que me gusta y para lo que estudié durante tantos años, sino que, sobre todo, pude volver al interior del país a estudiar y trabajar como Biólogo (algo que me parecía utópico en el momento en que me fui desde Melo a Montevideo a estudiar Ciencias Biológicas). Hoy eso es posible, y en agradecimiento a ello daré siempre lo mejor de mí como docente de la UDELAR para devolverle al país esta oportunidad que tuve. Pondré, en este sentido, mi granito de arena para que cada vez sean más los estudiantes que se puedan quedar en el interior estudiando en la UDELAR, y así contribuir a la ambiciosa pero tan necesaria equidad en las oportunidades de estudios en la Universidad para todos los jóvenes del país. Los jóvenes que estudian en las sedes de la UDELAR del interior generalmente se quedan y trabajan en las ciudades donde están situadas las mismas luego de finalizados sus estudios y ello fortalece y enriquece de diversas formas a esas sociedades. Salto es un claro ejemplo de ello. El hecho de que yo haya elegido defender mi tesis en el CUS (CENUR Litoral Norte) no se debe solamente a que realicé casi en su totalidad las investigaciones que derivaron en ella en sus instalaciones, sino que también lo concebí como un pequeño gesto simbólico en homenaje a esta campaña actual de descentralización y regionalización de la UDELAR. En este sentido, va también un agradecimiento especial de mi parte a Gregory Randall y su equipo, principal responsable de la misma a través del programa de Polos de Desarrollo Universitario (PDU), y otras importantes acciones que realizó como director de la Comisión Coordinadora del Interior y Pro rector de Investigación durante el rectorado anterior, período en el que me radiqué en la UDELAR de Salto.

- Mi orientador y jefe Rodney Colina, especialmente por la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, así como también por el apoyo brindado y la enseñanza transmitida durante el desarrollo de la tesis. Sobre todo agradezco la confianza depositada en mí para el desarrollo de este trabajo de tesis, así como en todas las actividades que desarrollé dentro de su grupo PDU como docente de la UDELAR. Se aprende mucho junto a Rodney cada día y se aprende a emprender tareas en colectivo.

- Mis co-orientadores, Juan Cristina y Jose Paulo Gagliardi Leite, por sus invaluable contribuciones durante el desarrollo de este trabajo de tesis. De ellos he aprendido mucho de lo que actualmente sé sobre ciencia desde mis inicios en esta área del conocimiento. Aún hoy continúo aprendiendo y estoy seguro que siempre tendrán algo para enseñarme en el futuro.

- A todos los colegas y amigos del Laboratorio de Virología Molecular-PDU (CUS), que contribuyeron directamente en los resultados alcanzados en esta tesis: Matías Victoria, Andrés Lizasoain, Mariana García, Matías Castells y Leticia Maya. Así como también al resto de los compañeros del grupo por su compañerismo y amistad: María José Benítez, Luciana Burutarán, Estefani Bertoni y Matías Salvo.

- A todos los colegas de los Laboratorios que forman parte del Departamento de Ciencias Biológicas del CENUR Litoral Norte quienes de una forma u otra han

colaborado en distintas instancias de la realización de esta tesis. En especial a los amigos de los “Laboratorios vecinos” por su colaboración, por las innumerables instancias de discusiones científicas (y no científicas) tan enriquecedoras, y sobre todo por su amistad: Luis Carvalho, Teresa Armúa, Manuel Venzal, Julio da Luz, Ana Soler, y Oscar Irabuena.

- Al ex-director del CUS, Alejandro Noboa, por el apoyo constante a nuestro grupo en todo lo que hemos necesitado desde el primer momento en que nos radicamos en la Sede a mediados del 2010. Especialmente agradezco el apoyo económico brindado mediante vehículos y choferes del CUS para la realización de la colecta de agua residual de forma quincenal durante todo el año 2011 en cuatro ciudades del Litoral Noroeste del país. Sabemos que fue un gasto significativo para la Sede, pero gracias a su voto de confianza cinco tesis de grado y posgrado se han formado a partir del análisis de esas muestras, así como la publicación de cinco artículos científicos en revistas internacionales indexadas. Estamos seguros de que otras tesis y artículos serán generados en el futuro a través del análisis de las mismas. Agradezco también a los choferes Jorge Damasena y Rodrigo González por el buen trato y las charlas que amenizaban las horas de viaje durante las colectas, así como al resto del personal docente y no-docente del CUS que tan amablemente me ha tratado desde mi radicación en la Sede.

- A las autoridades de la Sociedad Médico-Quirúrgica de Salto y del Hospital Departamental de Salto. En especial al personal de salud de las salas de Pediatría de ambas instituciones, por su colaboración en la colecta de muestras clínicas de niños hospitalizados con Gastroenteritis Aguda. Muy especialmente agradezco a las médicas pediatras Edit Arreseigor y Patricia López, por su invaluable colaboración y motivación para la realización de la colecta, y su participación activa en la discusión de los resultados obtenidos de su análisis. Ojalá mantengamos esta fructífera colaboración en el futuro para continuar con este y otro tipo de estudios e investigaciones tan importantes para la región y el país. De la mano de este agradecimiento, va uno especial a los padres y niños que amablemente accedieron a la donación de muestras para esta investigación.

- A todos los colegas y amigos del Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental, del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro Brasil, por su colaboración constante con nuestro grupo desde sus inicios, así como durante mi estadía de tres meses en ese laboratorio durante el año 2013. En especial a mi co-orientador Jose Paulo Gagliardi Leite y la jefa del grupo Marize Miagostovich por sus valiosos consejos y lectura crítica de todos los artículos científicos generados en el marco de esta tesis (y otros relacionados a la misma – Anexos 1 a 3). Mi agradecimiento además a Tulio Fumian por su colaboración en el estudio de los recombinantes de Norovirus (Artículo 2) y a Mariela Martínez Gómez por la lectura crítica de los artículos científicos de Rotavirus (Artículo 3 y 4).

- A todos los colegas y amigos del Laboratorio de Virología Molecular (LVM) del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN) de la Facultad de Ciencias (FCIEN) de Montevideo, por su colaboración constante con nuestro grupo desde sus inicios. En especial a mi co-orientador Juan Cristina por sus valiosos consejos y lectura crítica de todos los artículos científicos generados en el marco de esta tesis, a Álvaro Fajardo por su colaboración en el estudio de los recombinantes de Norovirus, y a Pilar Moreno y

Gonzalo Moratorio por su colaboración cuando tuvimos que utilizar las instalaciones del LVM del CIN.

- A la Sección Virología de FCIEN, en especial a Mabel Berois, Alvaro Alberti y Luciana Gillman, con quienes tuvimos un muy fructífero proyecto CSIC I + D en colaboración a través del cual se colectaron y analizaron las muestras de agua residual de las dos ciudades del litoral Este del país (Melo y Treinta y Tres). En especial agradezco a Mabel, por la lectura crítica del artículo científico sobre Rotavirus detectados en muestras de agua residual (Artículo 4).

- A Mónica Marín, por autorizarnos a utilizar la Ultracentrífuga de la sala de equipos pesados de la Sección Bioquímica de FCIEN donde realizamos la concentración viral de todas las muestras de agua residual analizadas en el presente trabajo de tesis. Así como a Lía Randall y Beatriz Garat (del Instituto de Química Biológica, de FCIEN) quienes nos prestaron los tubos para la Ultracentrífuga así como otros materiales, y realizaron las reservas del equipo.

- A Otto Pritsch por su colaboración en la utilización de las instalaciones de la Unidad de Biofísica de Proteínas (así como otras instalaciones) del Institut Pasteur de Montevideo (IPMON) para el crecimiento de la bacteria *Pseudomona aeruginosa*, y la infección de las mismas con el bacteriófago PP7 para crecimiento del mismo.

- A la institución CAPES de Brasil, por el apoyo económico recibido a través del proyecto CAPES/UDELAR: “Epidemiología Molecular y Monitoreo Ambiental de Gastroenteritis de Etiología Viral”, que financió mi estadía de tres meses en el LVCA-FIOCRUZ/RJ en modalidad “doctorado sándwich” así como los viajes de mi co-orientador JPG Leite al CUS/UDELAR.

- A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la UDELAR, por el apoyo económico recibido a través del proyecto CSIC I + D (2010): “Detección de virus entéricos en aguas residuales y tratadas del Uruguay”. Un agradecimiento a las autoridades de la empresa estatal O.S.E. (Obras Sanitarias del Estado), y sobre todo al personal del Laboratorio de aguas residuales (Mdeo) y al personal de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Melo y Treinta y Tres, co-colaboradores en el marco de este proyecto.

- Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), en el marco del cual pude realizar la presente tesis de doctorado en mi país.

- A toda mi familia (tíos/as, primos/as y sobrinos/as) y amigos (los de Melo, los de Montevideo -en especial a Diego Simón-, los de Río de Janeiro y los de Salto) por su constante apoyo, amistad, cariño y motivación brindados en todas las etapas de mi vida personal y profesional. Sé que mis logros personales los deja tan felices a ellos como a mí. Así me lo han demostrado siempre y ha sido una fuerza motivacional muy grande en todas las etapas de mi vida. A mi familia directa, mi hermana Paula, mi padre Luis, mi cuñado Rober, y sobre todo a mi madre Virginia que está siempre ahí apoyándome, guiándome y dándome su interminable y tan fundamental amor de madre aún hoy, después de treinta y cuatro años que me trajo a este mundo. Un agradecimiento especial a mis tíos Aída y Fernando que por problemas de salud no pudieron venir a la defensa de mi tesis como tenían planeado pero sé que siempre están ahí, y que este logro personal los deja muy felices.

- Agradezco especialmente, al amor de mi vida Marisabina. Su cariño, apoyo, comprensión y paciencia en esta etapa fueron más que fundamentales. Ella es mi

compañera de la vida y junto a ella soy muy feliz. Es esta felicidad la que más fuerza me ha dado en esta etapa de mucho estudio y trabajo.

## **A la memoria de mi abuela Eva.**

Ella, entre sus tantos consejos de abuela,  
al verme indeciso sobre qué estudiar en la UDELAR allá en el año 2000,  
y sabiendo de mi fascinación por la Biología,  
me contó de la existencia de una tal Facultad de Ciencias en Montevideo.

## INDICE

RESUMEN .....	10
1 – INTRODUCCIÓN .....	11
1.1 – Gastroenteritis y virus entéricos.....	11
1.2 – Virología ambiental.....	13
1.3 – Rotavirus del Grupo A (RVA).....	15
1.3.1 – Historia .....	16
1.3.2 – Estructura del virión .....	16
1.3.3 – Genoma y proteínas virales .....	18
1.3.4 – Replicación viral .....	20
1.3.5 – Clasificación .....	24
1.3.6 – Mecanismos de variabilidad genética y evolución .....	26
1.3.7 – Patogénesis .....	29
1.3.8 – Tratamiento y prevención.....	31
1.3.9 - Diagnostico.....	32
1.3.10 – Epidemiología de RVA .....	34
1.3.10.1 – Epidemiología molecular de RVA en el mundo .....	36
1.3.10.2 – Epidemiología molecular de RVA en América Latina y el Caribe.....	38
1.3.11 – Rotavirus en Uruguay .....	39
1.3.12 – RVA en aguas residuales urbanas.....	40
1.4 – Norovirus humanos .....	41
1.4.1 - Historia.....	42
1.4.2 – Estructura del virión .....	43
1.4.3 – Genoma y proteínas virales .....	44
1.4.4 – Replicación viral.....	46
1.4.5 – Clasificación .....	48
1.4.6 – Mecanismos de variabilidad genética y evolución .....	51
1.4.7 – Patogénesis y manifestaciones clínicas.....	52
1.4.8 – Tratamiento y prevención.....	54
1.4.9 – Diagnostico .....	55
1.4.10 – Epidemiología .....	57
1.4.10.1 – Epidemiología molecular a nivel mundial .....	60
1.4.10.2 – Epidemiología molecular en América Latina.....	61
1.4.11 – Norovirus humanos en aguas residuales.....	62
1.5 - Astrovirus humanos.....	63
1.5.1 - Historia.....	64
1.5.2 - Genoma y proteínas virales .....	64
1.5.3 - Estructura del virion.....	67
1.5.4 - Replicación viral.....	67
1.5.5 - Clasificación.....	70
1.5.6 - Mecanismos de variabilidad genética y evolución .....	72
1.5.7 - Patogénesis.....	74
1.5.8 - Tratamiento y Prevención .....	74
1.5.9 - Diagnóstico.....	75
1.5.10 - Epidemiología de MAstV-1 .....	77
1.5.10.1 - Epidemiología Molecular MAstV-1 en el mundo .....	78
1.5.10.2 - Epidemiología molecular de MAstV-1 en América Latina.....	79
1.5.11 - MAstV-1 en aguas residuales .....	81
1.5.12 - HAstV en aguas residuales de Uruguay .....	81
2 – IMPORTANCIA DE LA PROBLEMÁTICA ABORDADA. RELEVANCIA.....	82
3 – OBJETIVOS .....	84

3.1 – Objetivo general.....	84
3.2 – Objetivos específicos.....	84
4 – MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS .....	85
4.1 – Detección y cuantificación por técnicas de biología molecular de virus gastroentéricos en aguas residuales descargadas al Rio Uruguay ( <u>Artículo 1</u> ).....	86
4.2 – Detección de cepas recombinantes de NV a partir de muestras clínicas colectadas en casos de GAI durante el primer año de muestreo realizado en Salto ( <u>Artículo 2</u> ).....	96
4.3 – Epidemiología y caracterización molecular de RVA detectados en niños hospitalizados por GAI en Salto, durante el período de dos años completos (2011-2012) ( <u>Artículo 3</u> ).....	104
4.4 – Caracterización molecular, distribución geográfica y temporal de RVA en muestras ambientales de 6 ciudades localizadas al Noroeste y Este del país ( <u>Artículo 4</u> ).....	118
4.5 – Caracterización molecular, distribución geográfica y temporal de NV (GI y GII) en muestras ambientales de 6 ciudades localizadas al Noroeste y Este del país ( <u>Artículo 5</u> ).....	135
4.6 – Reconstrucción demográfica y filogeográfica de cepas de NV GII.4 detectadas a partir de muestras ambientales.....	154
4.6.1 – Metodología utilizada.....	154
4.6.2 – Resultados .....	155
4.7 – Epidemiología y caracterización molecular de MAsV-1 y NV detectados en niños hospitalizados por GAI en Salto, durante el período de dos años completos (2011-2012).....	156
4.7.1 – Materiales y Métodos .....	157
4.7.2 – Resultados .....	158
4.7.2.1 – Mamastrovirus-1 .....	158
4.7.2.2 – Norovirus humanos GI y GII .....	163
4.7 – Anexos .....	168
4.7 – Anexo 1: TCLA.....	168
4.7 – Anexo 2: Ficha epidemiológica del paciente.....	169
5 – DISCUSIÓN GENERAL GLOBALIZADORA .....	170
5.1 – Estudio epidemiológico prospectivo y descriptivo basado en análisis moleculares de RVA, NV y MAsV-1 en pacientes pediátricos hospitalizados con GAI en la ciudad de Salto.....	172
5.1.1 – Distribución de las infecciones por grupo etario.....	174
5.1.2 – Distribución temporal de las infecciones .....	175
5.1.3 – Detección de RVA y NV en muestras de vómito .....	176
5.1.4 – Caracterización molecular .....	178
5.1.4.1 – RVA .....	178
5.1.4.2 – NV .....	179
5.1.4.2a – Análisis de recombinantes en NV .....	179
5.1.4.2b – Epidemiología molecular de NV.....	180
5.1.4.3 – MAsV-1 .....	181
5.2 – Investigación de RVA y NV a partir de aguas residuales de 6 ciudades del interior de Uruguay .....	183
5.2.1 – Caracterización Molecular .....	185
5.2.1.1 - RVA.....	185
5.2.1.2 – NV .....	187
5.2.2 – Distribución de genotipos por región geográfica .....	188
5.2.3 – Distribución temporal de genotipos .....	188
6 – CONCLUSIONES .....	190
7 – PERSPECTIVAS.....	191
8 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	192
9 – ANEXOS: ARTÍCULOS RELACIONADOS AL PRESENTE TRABAJO.....	210
9.1 – Anexo 1 .....	210
9.2 – Anexo 2 .....	210
9.3 – Anexo 3.....	211
9.4 – Anexo 4 .....	211

## RESUMEN

Los Rotavirus del grupo A (RVA) son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda infantil (GAI) a nivel mundial. Los Norovirus (NV) humanos, son los principales agentes etiológicos de brotes por GA, y siendo descritos como la segunda causa a nivel mundial de GAI. Por otro lado, los Astrovirus humanos “clásicos” (MAstV-1), han sido descritos como la tercera causa de GAI a nivel global. Estos tres virus se transmiten por la vía fecal-oral, y, por lo tanto, pueden ser detectados y caracterizados a partir de aguas residuales como un reflejo de las cepas que circulan en la población. El objetivo de este estudio fue detectar y caracterizar molecularmente RVA, NVGI, NVGII y MAstV-1 a partir de muestras clínicas y ambientales colectadas en distintas regiones geográficas del Uruguay. La colecta de muestras clínicas fue realizada en la ciudad de Salto, mediante un estudio de epidemiología molecular prospectivo y descriptivo de dos años de duración (2011-2012), totalizando 175 muestras. Las muestras ambientales, fueron aguas residuales colectadas en las regiones Noroeste y Este del país. Las muestras al Noroeste, fueron colectadas de manera quincenal en 4 ciudades desde marzo de 2011 a febrero de 2012, totalizando 96 muestras. Las muestras al Este, fueron colectadas de manera bimensual en 2 ciudades desde setiembre de 2011 a abril de 2013, totalizando 20 muestras. Los virus presentes en las muestras ambientales fueron concentrados por ultracentrifugación. Las muestras clínicas, y los concentrados de las muestras ambientales, fueron analizados mediante protocolos de RT-PCR globalmente utilizados. Luego se realizó la caracterización molecular a través de análisis filogenético. Fue observada una prevalencia de 37% para RVA, 10,3% para MAstV-1 y 8% para NV, a partir de análisis de las muestras clínicas. Se pudo determinar la prevalencia de cada virus por edad y la estacionalidad de los mismos en dichas muestras. Se observó la presencia de genotipos comunes (G1P[8], G2P[4] y G3P[8]) y emergentes (G12P[8], G12P[9]) en humanos de RVA. Se detectaron genotipos globalmente distribuidos de NVGII, con la importante detección de la cepa pandémica *GII.4 New Orleans 2009*, y la detección de la cepa recombinante GII.P7-GII.6. Fueron detectados los genotipos HAstV-1, -2 y -3 de MAstV-1 circulando en las muestras clínicas. Interesantemente, fue posible detectar y caracterizar molecularmente RVA y NV a partir de muestras de vómito. Por otro lado, la caracterización molecular de estos virus a partir de agua residual mostro: i) una mayor prevalencia de estos virus en estas aguas que en casos clínicos, ii) una mayor diversidad genética de cepas circulantes, iii) la circulación de cepas inusuales en humanos de RVA (G3P[3]), iv) la sustitución de una cepa pandémica de *GII.4* por otra en el período de un año, siendo ambas introducciones asociadas a un aumento en el número de infecciones en la población, y vi) una correlación casi total entre las cepas observadas en las muestras clínicas y ambientales. Esto último, remarca la importancia de la investigación de virus entéricos a partir de aguas residuales como alternativa de vigilancia epidemiológica cuando no se tiene acceso a muestras clínicas de la población. Los datos generados en este estudio, representan los primeros que han sido obtenidos sobre estos tres virus en el interior del país, dos regiones geográficas diferentes de Uruguay, que son limítrofes con Argentina y Brasil. Por último, destacar que los resultados obtenidos remarcan la importancia de establecer una red de vigilancia a nivel nacional para estas virosis que afectan sobre todo a niños, debido a su amplia distribución en el territorio nacional.

## 1 – INTRODUCCIÓN

### 1.1 – Gastroenteritis y virus entéricos

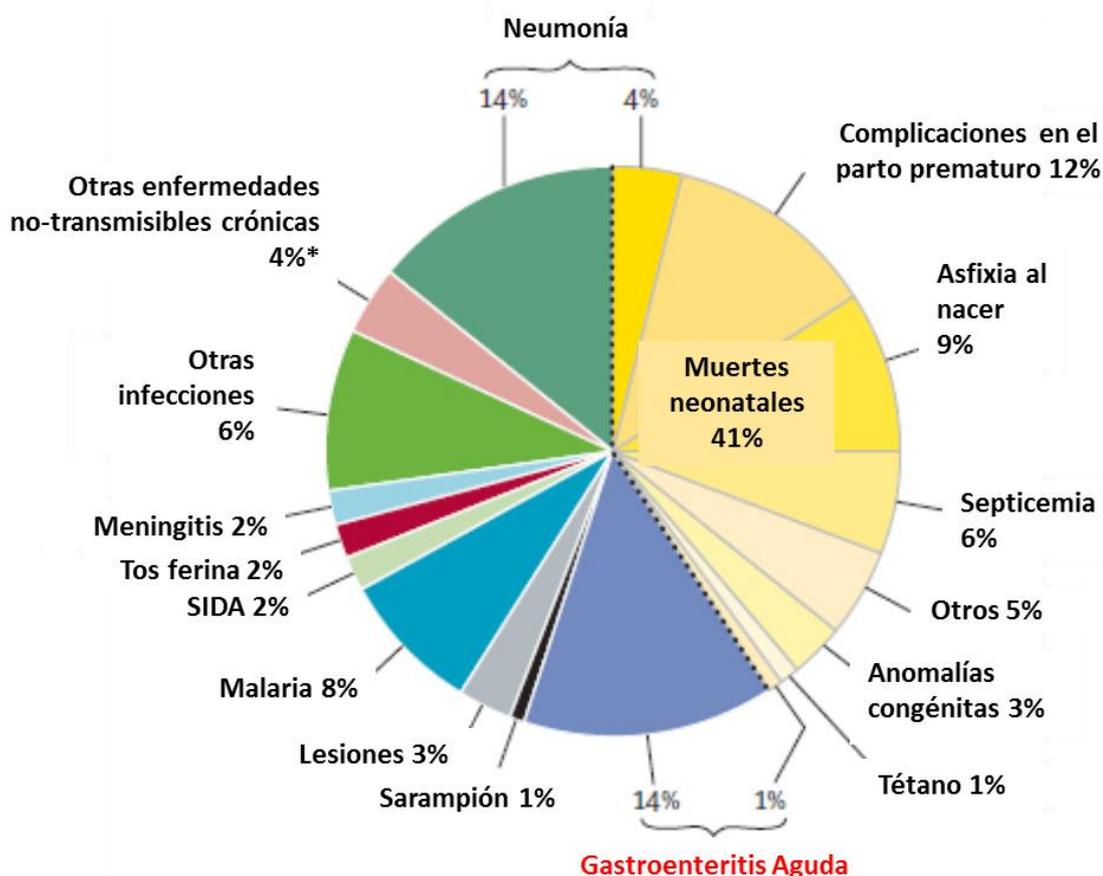
La Gastroenteritis se define como una variedad de estados patológicos del tracto gastrointestinal, y es provocada principalmente por diversos agentes infecciosos (virus, bacterias y parásitos) que invaden la mucosa gastrointestinal. La principal manifestación clínica es la diarrea (aumento de evacuaciones con materia fecal líquida o semilíquida), que puede venir acompañada de náusea, vómito, fiebre y dolor abdominal. La principal causa de hospitalizaciones y muertes a nivel mundial por esta enfermedad es el cuadro clínico denominado “Gastroenteritis Aguda” (GA), y comúnmente denominado como “Diarreas”. La GA se define en un paciente como la ocurrencia de tres o más evacuaciones líquidas o semilíquidas en un periodo de 24 horas, y con una duración de la enfermedad entre 1 y 7 días. A nivel mundial, la GA ha sido reportada como uno de los principales problemas de salud pública, y es la segunda causa de mortalidad en niños menores de 5 años de edad, apenas superada por las Neumonías (Figura 1.1) (Black et al., 2010).

La GA se torna peligrosa cuando el paciente pediátrico presenta un cuadro de deshidratación grave, que si no es tratado a tiempo, el niño puede entrar en *shock* y eventualmente fallecer. Los pacientes con mayor riesgo de hospitalización y muerte debido a la GA son principalmente niños entre 6 meses y 2 años de edad (Chandran et al., 2010).

La GA afecta de forma desproporcional a los niños en países en vías de desarrollo, donde existe una tasa de mortalidad más elevada debido principalmente a un acceso limitado al agua potable, carencias en el saneamiento básico y factores de riesgo nutricional, como el amamantamiento por un tiempo inferior al adecuado, deficiencia de zinc y vitamina A, sumados a un servicio precario de asistencia médica (Brown et al., 2009; Lamberti et al., 2011).

Antes de la identificación de los virus como agentes etiológicos de GA, más del 80% de los episodios de esta enfermedad no tenían causa definida. Fue a partir de la década del 70's, con el uso de la microscopía electrónica para analizar muestras fecales de pacientes con GA, que se pudo identificar estos agentes virales. Actualmente, los virus se definen como los agentes etiológicos más importantes de GA en el mundo, y entre los más comunes están aquellos pertenecientes a las familias virales *Reoviridae* (principalmente los Rotavirus del Grupo A – RVA), *Caliciviridae* (principalmente los Norovirus -NV- de los Genogrupos I y II – NVGI y NVGII), *Astroviridae*

(principalmente los Mamastrovirus 1 – MastV-1), y *AdeNV iridae* (principalmente los AdeNV irus entéricos – AdVE) (Wilhelmi et al., 2003). Solamente los RVA y NV en conjunto han sido reportados como responsables por más del 50% de las muertes por GA de niños menores de 5 años de edad a nivel global (Walker et al., 2013; Patel et al., 2008).



**Figura 1.1 – Causas de muerte a nivel global en niños.** Los datos de muertes están separados en neonatos entre 0 y 27 días de edad, y niños entre 1 y 59 meses de edad. No se muestran las causas que provocan menos de 1% de muertes. \*Incluye datos de anomalías congénitas. (Adaptado de *Black et al., 2010*).

Al año 2000 se estimaba entre 1.6 y 2.5 millones de muertes por año a nivel mundial a causa de la GA en niños menores de 5 años de edad (Kosek et al., 2003). Ya para el año 2008, una notable reducción a 1.3 millones de muertes había sido reportada (Black et al., 2010). Y finalmente, según un estudio más reciente, se ha reportado para el año 2011 la notable reducción a 700.000 muertes anuales por GA en niños menores de 5 años de edad en todo el planeta (Walker et al., 2013). A pesar de que se observa actualmente una reducción significativa de las muertes provocadas por esta enfermedad, esta tasa de mortalidad por GA permanece inaceptablemente alta, ya que se trata de

muerdes totalmente evitables mediante prevención y tratamiento. Existe un tratamiento sumamente efectivo y de fácil aplicación para pacientes con GA, que es el uso de soluciones de rehidratación oral (o intravenosa) suplementadas con Zinc. Y por otro lado, existen hoy en día varias vacunas, dos de ellas usadas globalmente, contra RVA (el principal agente etiológico de la GA infantil – GAI), que también han mostrado ser muy efectivas en la prevención de la GA de cualquier etiología (Dennehy, 2015; Santosham et al., 2011).

## **1.2 – Virología ambiental**

Los virus son uno de los agentes etiológicos más importantes en las enfermedades transmitidas por el agua (de transmisión hídrica). La mayoría de los virus de transmisión hídrica son aquellos que infectan el aparato digestivo y son excretados en las heces de las personas infectadas, por lo que se los denomina como virus entéricos. Dentro de ellos, los que tienen una mayor importancia epidemiológica para el humano son: RVA, NV, AdVE, MAstV-1, Virus de la Hepatitis A (VHA), Enterovirus (EV), Poliomavirus (PyV), Sapovirus (SV) y Virus de la Hepatitis E (VHE); los cuales tienen un alto impacto en la salud humana siendo causantes de diversas enfermedades, sin embargo, otros géneros menos frecuentes también pueden ser detectados como ser Picobirnavirus, Bocavirus, Aikivirus y Coronavirus (Metcalf et al., 1995).

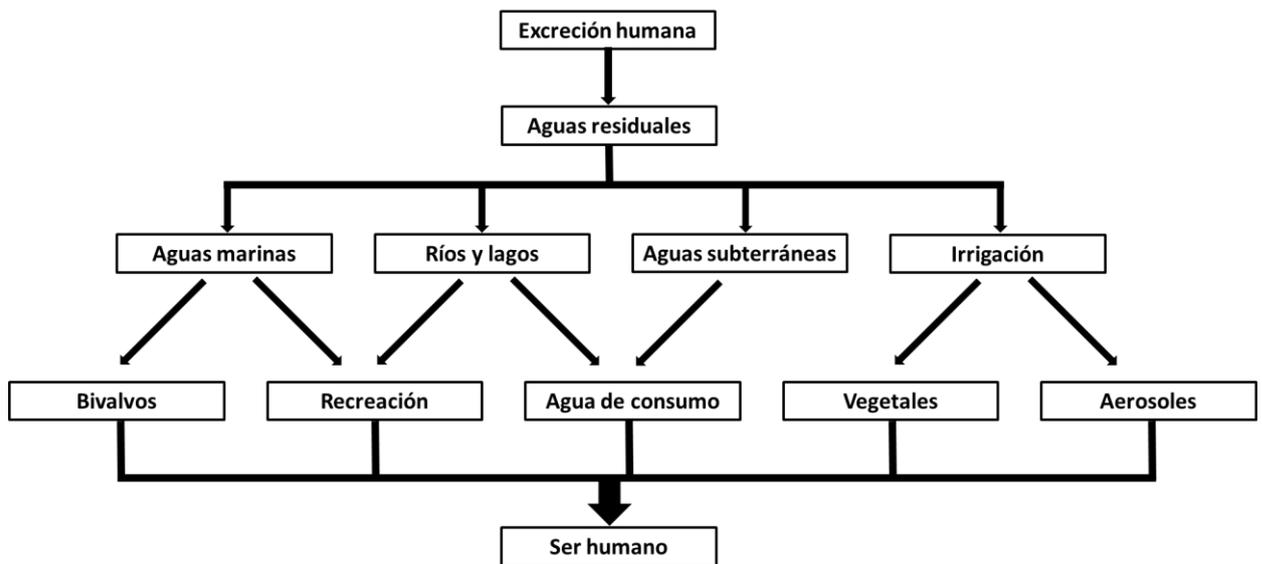
Los virus entéricos son introducidos en diferentes ambientes acuáticos principalmente mediante el vertido de aguas residuales, pero otras vías también pueden ser: la fuga de sistemas sépticos, escorrentía urbana y agrícola, así como también a través del vertido de aguas residuales de buques (Fong y Lipp, 2005).

Estos virus entéricos presentan algunas características en común que los convierten en un agente de contaminación frecuentemente encontrado en aguas medioambientales, pudiendo ser fácilmente transmitidos a individuos susceptibles que entran en contacto con estas aguas; tales como: gran resistencia a las condiciones desfavorables del medio ambiente (pH, temperatura, radiación UV), baja dosis infectante (entre 10 y 100 partículas virales infecciosas) y que son eliminados en las heces de los individuos infectados en grandes cantidades (hasta  $10^{13}$  partículas virales infecciosas por gramo de materia fecal) (Olives & Mas, 2007).

La Virología Ambiental estudia la diseminación de virus en diferentes tipos de matrices ambientales (aguas –superficiales, subterráneas, residuales urbanas–, fómites –por ejemplo: superficies hospitalarias–, alimentos –principalmente aquellos que se

consumen crudos o semicrudos, por ejemplo: ostras—, y el aire), y como estos virus persisten en el ambiente y a través de que vías pueden llegar a entrar en contacto con un individuo susceptible (Sinclair et al., 2009; Verreault et al., 2008; Carter, 2005; Asano & Cotruvo 2004; Sattar, 2004).

Una de las principales líneas de investigación dentro de la Virología Ambiental es el análisis de la presencia de virus entéricos humanos de transmisión hídrica, una lista de virus muy extensa y diversa, y que aún no conocemos en su totalidad (Aw et al., 2014). En este sentido, esta disciplina estudia, entre otras cosas: la incidencia y comportamiento de los virus en las distintas matrices acuáticas, el riesgo de infección de un individuo que entra en contacto con éstas aguas, la eficiencia de los procesos de tratamiento y desinfección de aguas residuales, y también aporta conocimiento al monitoreo rutinario de la calidad del proceso de potabilización del agua (Bosch et al., 2008; Carter, 2005; Bosch, 1998).



**Figura 1.2** - Esquema representando las múltiples rutas de transmisión a humanos de virus entéricos a través del vertido de aguas residuales a sus diferentes cuerpos receptores (adaptado de Bosch et al., 1998).

Las aguas residuales urbanas son una de las fuentes de diseminación de virus entéricos más importante, en las cuales grandes concentraciones de estos virus son eliminadas diariamente a través del sistema de saneamiento hacia las redes de aguas cloacales y plantas de tratamientos de aguas residuales (cuando éstas existen), que finalmente son volcadas a cuerpos receptores en el ambiente como ser ríos, arroyos, lagos, estuarios, mares y océanos. Estos cuerpos receptores son luego utilizados para generar agua de consumo, riego en campos de agricultura, lavado de frutas y vegetales

(que generalmente se consumen crudos), para el cultivo de alimentos (por ejemplo, mariscos que generalmente también se consumen crudos o semicrudos) y para actividades recreacionales (zonas de playa, baño, pesca y deportes acuáticos); y de esta manera, los virus entéricos de transmisión hídrica son una de las principales causas de enfermedades relacionadas con el agua (Figura 1.2) (Metcalf et al., 1995; Bosch et al., 1998; Carter, 2005; Bosch et al., 2008).

Cabe resaltar que numerosos estudios a nivel mundial evidencian la resistencia de los virus entéricos a los diversos tratamientos realizados para mejorar la calidad del agua residual previo a su descarga en cursos naturales de agua y se ha demostrado que incluso éstos pueden conservar su capacidad infectiva en los efluentes (Kitajima et al. 2014; Hata et al. 2013; Franczy et al. 2012; Schlindwein et al. 2010; Morsy El-Senousy et al. 2007).

El agua residual contiene principalmente virus entéricos excretados por pacientes pediátricos o adultos mayores con GA, que son los grupos etarios más afectados por estos virus, pero también contiene: i) virus excretados por individuos de todas las edades, sean estos sintomáticos o asintomáticos, y ii) virus de origen animal, debido a que las personas generalmente desechan las heces de sus animales (mascotas) en la red de saneamiento de sus hogares; siendo que algunas de estas cepas animales, dependiendo del virus, puede tener un potencial zoonótico importante (por ejemplo: RVA). De esta manera, la vigilancia ambiental de virus -principalmente mediante el uso de técnicas moleculares- presentes en aguas residuales urbanas, es una herramienta muy útil y potente para obtener un panorama completo de la diversidad genética viral que circula en todos los individuos de la población. Así, se pueden obtener datos que reflejen por sí solos (o complementen estudios realizados con muestras clínicas de pacientes con GA), los virus entéricos que están infectando una población específica en un tiempo y lugar determinado, permitiendo realizar estudios de epidemiología molecular de estos virus en dicha población (Bosch et al., 2008; Carter, 2005; Bosch, 1998; Metcalf et al., 1995).

### **1.3 – Rotavirus del Grupo A (RVA)**

Los Rotavirus constituyen los agentes etiológicos más importantes de Gastroenteritis Aguda Infantil (GAI) en niños menores de 5 años de edad en todo el mundo. Su incidencia es similar tanto en países en vías de desarrollo como en aquellos desarrollados, siendo responsables de entre 30 y 50% de los casos de GAI a nivel

global. Sin embargo, se registran tasas de hospitalización y mortalidad elevadas sobre todo en países en vías de desarrollo; donde este virus, comparado con otros agentes etiológicos (virus, bacterias y parásitos), es la causa principal de GAI severa en niños de hasta dos años de edad (Estes & Greenberg 2013; Kotloff et al., 2013; Platts-Mills et al., 2015).

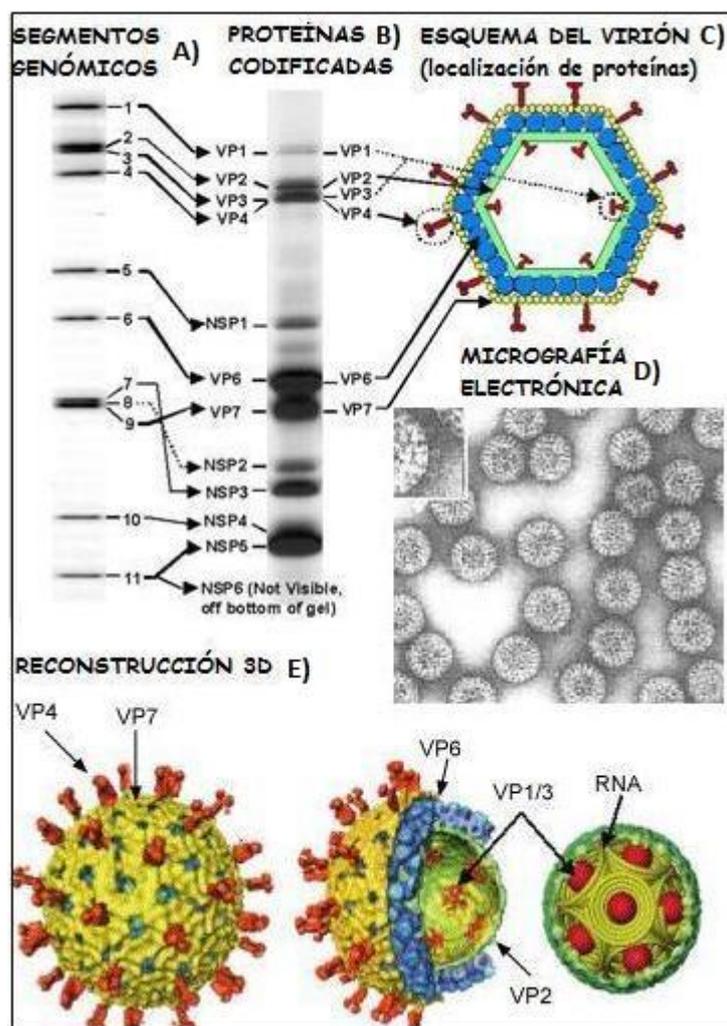
### **1.3.1 – Historia**

Los RV fueron descubiertos por primera vez por Bishop y col. (1973) a través del análisis por Microscopía Electrónica (ME) de células epiteliales del duodeno de un niño con GA. Éstos autores describieron la presencia de vesículas citoplasmáticas con partículas virales semejantes a los Orbivirus, y los denominaron *Orbivirus-like agent*. Partículas virales semejantes también fueron detectadas por Flewett y col. (1974) en la materia fecal de niños con GA. Luego de estos descubrimientos, estos virus fueron denominados Duovirus (Davidson et al., 1975). Finalmente, fue propuesta la denominación de Rotavirus, debido al aspecto similar a una rueda (“rota” en latín significa rueda) de la partícula viral cuando es observada por ME utilizando la técnica de contrastación negativa (Figura 1.3D), y fueron constituidos como un nuevo género denominado *Rotavirus*, dentro de la familia *Reoviridae* (Flewett & Wood, 1978). Su primera detección en América Latina fue realizada en Brasil, por Linhares y col. (1973), también al examinar materia fecal de niños con GA por ME.

### **1.3.2 – Estructura del virión**

La partícula viral (o virión) tiene aproximadamente 100 nanómetros (nm) de diámetro, desnuda, con simetría icosaédrica y está constituida de tres cubiertas concéntricas de proteínas que rodean el genoma viral y se denominan (de adentro hacia afuera) de la siguiente manera: Cápside interna (o *Core* viral), Cápside intermedia, y Cápside externa (Figura 1.3C y E). El *Core* viral está compuesto de 120 copias de la proteína VP2. Se ha descrito que dicha proteína mantiene contacto con el complejo de la polimerasa viral compuesto por las proteínas VP1 (la ARN-polimerasa ARN-dependiente viral) y VP3 (proteína con actividad guanidil- y metil-transferasa, y que es la enzima responsable por la adición del CAP al ARN mensajero viral) (McClain et al., 2010). La cápside intermedia está constituida por 260 trimeros de la proteína VP6 que por un lado le brindan estabilidad al *Core* viral, y por el otro funcionan como un adaptador para la cápside externa, que es esencial en las etapas de adsorción y

penetración viral en la célula huésped. Ésta última cubierta proteica, está compuesta por trímeros de la glicoproteína VP7, directamente posicionados sobre la proteína VP6. Los trímeros de VP7 son dependientes de  $-y$  se encuentran asociados a los iones de Calcio ( $Ca^{2+}$ ), los cuales mantienen la estabilidad de este trímero. Además de la proteína VP7, en la cápside externa está compuesta también por 60 trímeros de la proteína VP4, que sobresalen de la superficie de la cápside externa constituyendo las espículas virales propiamente dichas. La proteína VP4 es el receptor viral propiamente dicho, actuando también VP7 como correceptor durante el proceso de adsorción y penetración viral (Patton, 2012).



**Figura 1.3 – Estructura del virión y genoma viral.** A) Resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) del ARN genómico de rotavirus (cepa viral de rotavirus simio SA11, en este caso) en el que se visualiza el electroferotipo típico de rotavirus, con sus 11 segmentos genómicos numerados a la derecha de la figura. B) Resultado de una EGPA con las proteínas virales codificadas por cada segmento genómico. C) Dibujo esquemáticos del virión de rotavirus mostrando la ubicación en la

partícula viral de cada una de sus proteínas estructurales. **D)** Micrografía electrónica obtenida por la técnica de microscopía electrónica de transmisión con contrastación negativa de un preparado conteniendo partículas virales de rotavirus (gentilmente cedida por la Dra. Monika Barth, Laboratorio de Morfología y Morfogénesis Viral, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). **E)** Reconstrucción tridimensional (3D) de la partícula viral de rotavirus realizada a partir de datos obtenidos de análisis de viriones por Criomicroscopía Electrónica asociada al uso de programas bioinformáticos que realizan el procesamiento de las imágenes, mostrando las proteínas estructurales del virus que conforman cada una de las tres cubiertas proteicas que rodean el genoma viral, mediante cortes transversales y longitudinales de las figuras. (Figura adaptada de *Pesavento et al., 2001; Jayaram et al., 2004; Estes et al., 2001*).

### 1.3.3 – Genoma y proteínas virales

Los rotavirus poseen un genoma de ARN doble hebra (ARNdh) segmentado. El genoma está formado por 11 segmentos de ARNdh (Figura 1.3A), denominados segmentos genómicos, y si concatenamos todos los segmentos el genoma tendría una longitud aproximada de 18.522 pb. Los 11 segmentos genómicos varían en longitud entre 667 pb (segmento 11) a 3302 pb (segmento 1), y cada uno de ellos codifica para una proteína viral, con excepción del segmento 11 que puede codificar para 2 proteínas (Figura 1.3B), por lo tanto, siendo en total 11 o 12 proteínas virales: 6 proteínas estructurales (VP1-4, VP6-7) y 5 o 6 proteínas no-estructurales (NSP1-6). Los segmentos genómicos están compuestos por una hebra de polaridad positiva y otra de polaridad negativa que se aparean completamente de punta a punta, garantizando una mayor estabilidad del segmento genómico (Estes & Greenberg, 2013).

La cepa prototipo SA11 (de origen simia) fue la primera en tener su genoma totalmente secuenciado. Actualmente, se ha secuenciado el genoma completo de diversas cepas de rotavirus provenientes de humanos y animales (Matthijnsens et al., 2011).

Los segmentos genómicos de rotavirus tienen una estructura similar con las siguientes características en común: i) tienen una secuencia nucleotídica rica en adenina y uracilo (58-67%), ii) una estructura CAP (o “caperuza”) en el extremo 5’ formada por la secuencia: *m7GpppG(m)GP*y, iii) no tienen cola poli-A en el extremo 3’, iv) tienen (la mayoría) un único marco abierto de lectura (*ORF*, del inglés: *Open Reading Frame*), v) el *ORF* se encuentra flanqueado por regiones no-codificantes en sus extremos 5’ y 3’, que pueden variar en longitud, pero presentan en común pequeñas secuencias nucleotídicas que son usadas como señales para: transcripción, transporte de los ARN virales, replicación y empaquetamiento de los segmentos genómicos en el *Core* durante

la morfogénesis viral. Todos los segmentos deben presentar los mismos elementos reguladores en *cis* ya que son todos replicados por la misma polimerasa (Figura 1.4A y B). Por otro lado, cada segmento debe tener una señal única porque deben ser distinguidos uno de otros durante su empaquetamiento en el *Core* en la morfogénesis viral (Figura 1.4C) (McDonald & Patton, 2011; Estes & Greenberg, 2013).

Se conocen en la actualidad las funciones principales de las proteínas virales de rotavirus, las cuales han sido ampliamente estudiadas (Estes & Greenberg, 2013), y las mismas son (Figura 1.4D):

**VP1)** “Polimerasa viral”, es una Polimerasa de ARN dependiente de ARN.

**VP2)** Forma el *Core* o cápside interna, y también forma parte del “complejo de replicación” (formado por VP1, VP2 y VP3).

**VP3)** Es una Metil- y Guanidil-transferasa, además es la responsable de la adición del CAP en el ARN mensajero viral (ARNmv).

**VP4)** Es la “espícula viral”, y es la proteína viral que realiza la primera interacción con el receptor celular en la membrana plasmática de la célula blanco, y por lo tanto participa en los procesos de adsorción y penetración viral. Es susceptible a proteólisis por parte de tripsina pancreática, y la acción de esta enzima celular sobre VP4 es fundamental, ya que resulta en la exposición de sitios activos mediante la modificación estructural de VP4, transformándose ésta en dos péptidos: VP5\* y VP8\* (que permanecen asociados al virión), que son los directamente responsables (en conjunto con VP7) de la adsorción y penetración viral.

**VP6)** Forma la cápside intermedia. Es la proteína más abundante del virión (representando aprox. 51% de las proteínas que lo componen). Probablemente sea esta la causa por la cual la mayoría de los anticuerpos generados durante una infección de rotavirus sean contra ésta proteína. Participa en dos funciones importantes: a) adsorción y penetración viral (mediante su interacción con VP4 y VP7), y b) “transcripción endógena” de los segmentos genómicos (interaccionando con VP2, y formando los canales por los cuales salen los nuevos ARN virales desde el interior de la partícula viral hacia el citosol).

**VP7)** Es la única glicoproteína del virión. Junto con VP4 forman la cápside externa. Actúa como co-receptor viral, modulando la actividad de VP4 al interactuar con otros receptores celulares luego del proceso de adsorción mediado por la porción (o péptido) VP5\* de la proteína VP4. Como fue mencionado anteriormente, la estabilidad de sus trímeros depende de  $Ca^{2+}$ . Cuando el virión es endocitado por la célula blanco, la

baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de éste desestabiliza los trímeros de VP7, lo que se refleja en un arreglo distinto de VP4, que desencadena la entrada del virus al citosol celular.

**NSP1)** Actúa como antagonista del Interferon tipo 1 (IFN-I), inhibiendo su expresión en la célula hospedera. De esta forma inhibe la principal respuesta inmune innata contra las infecciones virales.

**NSP2)** Es una NTP-asa. Y es responsable junto con NSP5 de la formación del “Viroplasma” o “fábrica viral”. Éste, es un cuerpo de inclusión citoplasmático que se forma durante una infección con rotavirus, y es dentro de él que ocurre el ensamblaje parcial del virión (virión sin cápside externa) y la replicación del genoma. Los Viroplasmas ofrecen un ambiente protegido (de nucleasas celulares y de la respuesta inmune) para que estos procesos ocurran.

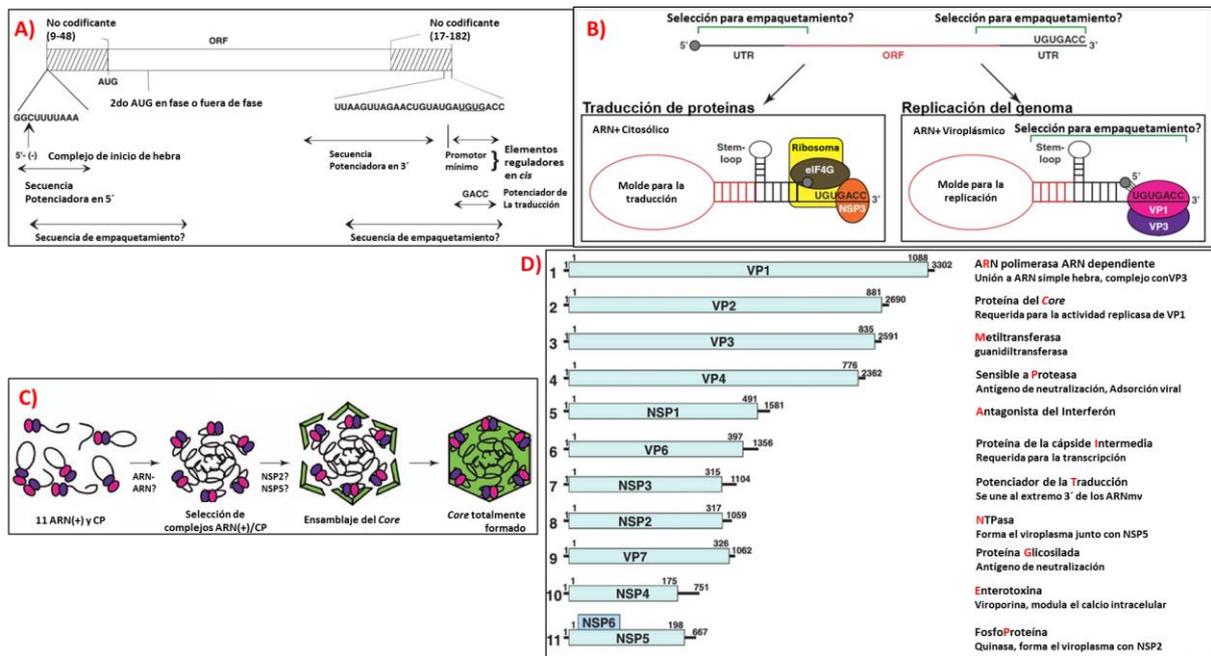
**NSP3)** Es un potenciador de la traducción. Compite con la proteína de unión a la cola Poli-A celular (PABP, del inglés: *Poli-A binding protein*) por la unión al factor de inicio de la traducción *eIF4G*. Por lo que se sugiere que esta proteína podría favorecer la traducción de los ARNm virales frente a los ARNm celulares, provocando la interrupción de la síntesis proteica celular (o *shut-off* celular). Aunque algunos estudios recientes demuestran que no es fundamental para la traducción del ARNm.

**NSP4)** Es la primer enterotoxina viral descrita. Es capaz de producir GA por sí sola, en una célula sin infección con rotavirus. También se encuentra involucrada en el proceso de morfogénesis, en la etapa final de la misma, es responsable de que la partícula viral adquiera la cápside externa antes de su egreso.

**NSP5 & NSP6)** La primera es una fosfoproteína con actividad autoquinasa. Junto con NSP2 forman el Viroplasma. La segunda es codificada por el mismo segmento genómico (11) en un ORF diferente, e interacciona con NSP5 en el Viroplasma; algunas variantes de rotavirus no codifican para ésta última proteína (NSP6).

### **1.3.4 – Replicación viral**

La replicación de los rotavirus ocurre en el tercio apical de los enterocitos maduros de las microvellosidades de los primeros dos tercios del intestino delgado (Estes & Greenberg, 2013).



**Figura 1.4 – Estructura de los segmentos genómicos de rotavirus y funciones principales de sus proteínas codificadas.** **A)** Características principales de los segmentos genómicos de rotavirus. El esquema muestra la estructura general de los segmentos genómicos de rotavirus basado en el análisis de secuencias publicadas de los segmentos 1 al 11. **B)** Esquema mostrando la interacción que se cree que ocurre entre las regiones no codificantes de los extremos 5' y 3' del ARN de polaridad positiva (ARN(+)) capeado. Ésta interacción se da a través del apareamiento de bases que permite la formación de un ARN con estructura secundaria con forma de “bucle” (*panhandle structure* en inglés), que sirve por un lado como molde para la traducción (en el citosol) y por otro lado como molde para la replicación (en el viroplasma). **C)** Modelo más aceptado en la actualidad que explica el mecanismo por el cual los 11 ARN(+) son empaquetados dentro del *Core* durante la morfogénesis viral. En este modelo los 11 PC/ARN(+) son reconocidos entre si vía interacciones específicas localizadas en cada uno de los 11 ARN(+) –indicadas como *selective packaging sequences* en las partes A y B) de esta misma figura–, para que luego VP2 se ensamble alrededor de estos 11 PC/ARN(+) formando así un *Core* completo y competente para realizar la replicación. Se cree que NSP2 y NSP5 podrían funcionar para regular el tiempo del ensamblaje del *Core*. **D)** Esquema de la estructura del genoma de rotavirus, basado en el análisis de la cepa prototipo SA11. Se muestra el largo de cada segmento en nucleótidos, y el largo en aminoácidos de cada proteína que codifican. Las líneas negras a los extremos 5' y 3' representan las regiones no-codificantes. A la derecha de cada segmento genómico se muestran algunas de las funciones principales de cada proteína viral, marcando en rojo la letra que es usada para el nuevo sistema de clasificación basado en el genoma completo de rotavirus, propuesto por el RCGW: Matthijenssens et al., 2011. (Figura adaptada de McDonalds & Patton, 2011; Estes & Greenberg 2013).

En primera instancia, durante el proceso de adsorción viral (proceso complejo que involucra muchas proteínas y que todavía no fue completamente dilucidado), la

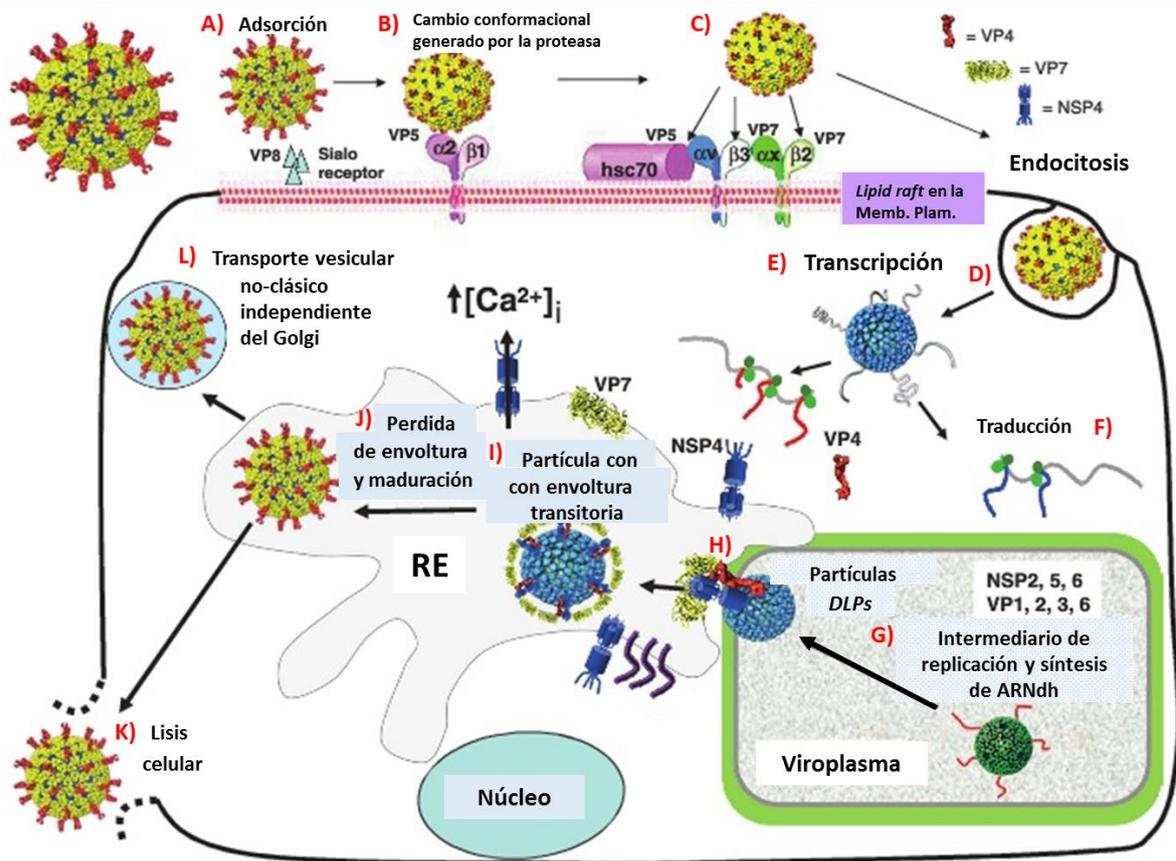
tripsina pancreática del tracto gastrointestinal cliva las espículas virales (VP4), transformándola en VP5\* y VP8\*. El péptido VP8\* sería el responsable de la primera interacción del virus con la célula huésped durante el proceso de adsorción viral (*binding receptor*). En algunos casos se observa la interacción de VP8\* con proteínas celulares de membrana ricas en ácido siálico (Figura 1.5, parte A), pero se cree que otras proteínas de la superficie celular también actúan como receptores de este virus.

Luego de la unión inicial de VP8\*, el péptido VP5\* actúa como co-receptor viral durante la adsorción (o *post-binding receptor*), uniéndose a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  (Figura 1.5, parte B). Luego, se cree que VP5\* interaccionaría con la chaperona hsc70 (Figura 1.5, parte C). La proteína VP7 también actuaría como *post-binding receptor*, ya que fue demostrado que también se une a las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha x\beta 2$  (Figura 1.5, parte C) (Lopez & Arias, 2006).

El mecanismo de penetración viral no ha sido aún dilucidado. Por lo cual, se proponen los siguientes mecanismos: i) endocitosis mediada por receptor, ii) penetración directa en *raft* lipídicos, que son microdominios lipídicos que poseen una alta densidad de glicosfingolípidos y un conjunto específicos de proteínas de superficie celular, tales como chaperonas e integrinas. Se cree que posiblemente más de un mecanismo de penetración actúe en el caso de rotavirus (Figura 1.5, parte D) (Isa et al., 2004). Una vez el virus ingresa al citosol, la concentración baja de  $Ca^{2+}$  que allí existe, desencadena la desestabilización de los trímeros de VP7 y la pérdida de la cápside externa. La pérdida de ésta, activa el complejo polimerasa (CP), formado por VP1 y VP3, en el *Core*, y los ARN(+) capeados son transcriptos desde la partícula doblemente envueltas (*DLPs*, del inglés: *Double-Layered Particles*) hacia el citosol, proceso conocido como transcripción endógena (Figura 1.5, parte E) (Lawton et al., 1997). Este ARN(+) sirve tanto como ARNm para sintetizar las proteínas virales (Figura 1.5, parte F), así como molde para producir ARN(-) durante la replicación viral (Figura 1.5, parte G, y Figura 1.4B) (Lopez & Arias, 2006; Isa et al., 2004).

Las proteínas sintetizadas y los ARN(+) son reunidos en el citosol de la célula infectada, formando un material amorfo denominado Viroplasma (ver descripción en sección anterior). El empaquetamiento del genoma se inicia cuando el CP se une al extremo 3' del ARN(+) viral. Se cree que existe una interacción entre los 11 segmentos genómicos, y que la proteína VP2 se organiza entorno a los mismos formando el *Core* y activando los CPs (Figura 1.5, parte G y Figura 1.4C). La proteína VP6 reconoce el

Core sintetizado y se ensambla sobre él formando las *DLPs* (Figura 1.5, parte H) (McDonalds & Patton, 2011; Estes & Greenberg, 2013).



**Figura 1.5 – Ciclo de replicación viral de rotavirus.** Las letras rojas de A) a L) hacen referencia a los pasos del ciclo replicativo y se explican de forma resumida cada uno de ellos en el texto, en la sección “1.3.4 – Replicación viral”. (Figura adaptada de Estes & Greenberg, 2013).

La proteína NSP4 se inserta en la membrana del retículo endoplasmático (RE) como una proteína transmembrana. El dominio citoplasmático de NSP4 se une a las *DLPs* mediante su unión a VP6, para enseguida unirse también a VP4 y VP7 que también se encuentran insertadas en la membrana del RE (Figura 1.5, parte H), propiciando de esta forma el brotamiento de las *DLPs* hacia lumen del RE, y la formación de *DLPs* con envoltura transitoria (Figura 1.5, parte I), que enseguida pierden esta envoltura formándose finalmente las partículas virales maduras triplemente envueltas o *TLPs* (Figura 1.5, parte J) (del inglés: *Triple-Layered Particles*). Luego del egreso del virión de la célula, la tripsina pancreática de tracto gastrointestinal cliva VP4 en VP8 y VP5, lo que finalmente resulta en la formación del virión completo infeccioso (Estes & Greenberg, 2013).

Estudios *in vitro* indican que el virus puede salir de la célula a través de lisis celular (Figura 1.5, parte K) o mediante la utilización de una vía secretora (Figura 1.5, parte L) (Musalem & Espejo, 1985; Jourdan et al., 1997; Trask et al., 2012).

### 1.3.5 – Clasificación

Los *Rotavirus* constituyen un género dentro de la familia *Reoviridae*. El género Rotavirus es dividido en 8 especies o grupos denominados con las letras A a H, y con la siguiente nomenclatura: Rotavirus del grupo A -RVA- a RVH (ICTV, 2015). Esta clasificación de los *Rotavirus* en especies o grupos fue inicialmente establecida en base a determinantes antigénicos presentes en la proteína VP6, lo que fue recientemente corroborado mediante análisis filogenéticos basados en su secuencia aminoacídica (Matthijnssens et al., 2012).

Los RVA, B y C infectan tanto humanos como otros mamíferos, mientras que los RVD a RVG han sido encontrados solo en mamíferos no-humanos (de ahora en más llamados como “animales” para diferenciarlos de los humanos) y aves (Estes & Greenberg, 2013). En tanto, el RVH ha sido recientemente incorporado como una nueva especie, siendo identificado a la fecha solo en adultos humanos en China y Bangladesh (Matthijnssens et al., 2012). EL RVA ha sido claramente establecido como el principal agente etiológico de GA en niños pequeños y en individuos jóvenes de varios animales y aves. Los RVB han sido asociados con epidemias anuales de diarrea grave en adultos y los RVC se han reportado esporádicamente en muestras fecales de niños con diarrea y en varios brotes dentro del grupo familiar, pero su importancia clínica no está clara. Debido a su importancia epidemiológica en humanos (principalmente) y en animales domésticos de producción pecuaria y de estimación (mascotas), siendo responsables de más del 90% de los casos de GA que ocurren en estos, se ha establecido un sistema de clasificación binaria para diferenciar las diferentes estirpes de RVA (Estes & Greenberg, 2013).

El sistema de clasificación binaria para los RVA, se basa en las propiedades inmunológicas (determinando serotipos) y genéticas (determinando genotipos) de los genes que codifican para las dos proteínas de la cápside externa de la partícula viral, VP4 y VP7 (similar al que existe para los virus Influenza A, con base en las proteínas Hemaglutinina y Neuroaminidasa). El gen de la proteína VP4 define los serotipos/genotipos “P” (*P*, de sensible a *Proteasa*), en tanto que el gen de la proteína VP7 define los serotipos/genotipos “G” (*G*, de *Glicoproteína*). En lo que se refiere a la

nomenclatura de este sistema de clasificación binario de RVA, la designación de los serotipos G coincide con la designación de los genotipos G, siendo respetada la siguiente regla: la letra “G” acompañada del número de serotipo/genotipo correspondiente. Por otro lado, una nomenclatura dual fue adoptada para la clasificación serológica y genética con base en la proteína VP4. Ya que para el caso de VP4, al contrario de lo que ocurre con VP7, los serotipos y genotipos determinados a partir de esta proteína no coinciden. De esta forma, los serotipos son descriptos con la letra “P” acompañada del número de serotipo y/o número de genotipo correspondiente entre paréntesis recto. A modo de ejemplo, la cepa viral de RVA que más circula en todo el mundo es clasificada de acuerdo a este sistema de la siguiente manera: G1P1A[8] (Estes & Greenberg, 2013).

La elevada variabilidad genética de los genes que codifican para las proteínas VP4 y VP7 en RVA, ha determinado que actualmente se conozcan 37 genotipos P y 27 genotipos G, respectivamente (Matthijnsens et al., 2011; Trojnar et al., 2013).

Recientemente, el *Rotavirus Classification Working Group (RCWG)* ha propuesto un nuevo sistema de clasificación para RVA basado en la secuencia de genomas completos. En el mismo se asignan diferentes genotipos para cada uno de los 11 segmentos genómicos, de acuerdo a valores de *cut-off* específicos de identidad nucleotídica para cada uno de los genes. Los genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 son descriptos usando las siguientes abreviaciones: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x = número arábigos a partir de 1), respectivamente. Basados en esta clasificación, ya fueron descritos los siguientes genotipos: 27 G-, 37 P-, 17 I-, 9 R-, 9C-, 8 M-, 16 A-, 10 N-, 12 T-, 15 E-, y 11 H. Adicionalmente, el *RCWG* ha propuesto la siguiente nomenclatura para las cepas individuales de *Rotavirus*: Especie de *Rotavirus*/nombre común de la especie hospedera de origen (identificando también si fue obtenido directamente de una muestra clínica -*wt*, del inglés: *wild type*-, de cultivo celular -*tc*, a partir de ingeniería genética en el laboratorio -*lab*, del inglés: *laboratory*-, del inglés *tissue culture*-, o de una muestra ambiental -*Env*, de inglés *Environment*)/ país de identificación (utilizando la abreviación de tres letras según el código *ISO 3166-1 alpha-3*)/nombre asignado a la cepa por el grupo de investigación/ año de identificación/ G-tipo (Gx: x = serotipo/genotipo) y P-tipo (Py[x]: y = serotipo, x = genotipo). A modo de ejemplo, según este nuevo sistema de clasificación genómica de RVA la cepa prototipo de rotavirus simio *SA11* tiene los siguientes genotipos: G3-P[2]-I2-R2-C5-M5-A5-N5-T5-

E2-H5, y la siguiente nomenclatura del aislado con número de acceso DQ841262 en *Genbank*: RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2] (Matthijnsens et al., 2011).

Por último, los RVA también han sido clasificados en *genogrupos* en base a estudios de hibridación de sondas hechas con ARNm de una cepa conocida, con los 11 segmentos genómicos de la cepa problema que se quiere clasificar (Flores et al., 1985). Los dos genogrupos comúnmente detectados en humanos son: i) el *Wa-like* (que agrupa a los G- y P-genotipos comúnmente detectados en humanos: G1, G3, G4 y G9 asociados a P[8]), y ii) el *DS-1-like* (que agrupa únicamente al genotipo comúnmente detectado en humanos G2P[4]). Un tercer genogrupo, no muy frecuente en humanos, el *AU-1 like*, agrupa los genotipos atípicos en humanos: G3P[9], G12P[9] (Nakagomi et al., 1990). Estos 3 genogrupos fueron posteriormente observados en estudios de genómica de RVA (Matthijnsens et al., 2008), y una constelación genómica conservada (excluyendo los G- y P-tipos) I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, o I3-R3-C3-M3-A3/A12-N3-T3-E3-H3/H6, clasificadas como genotipo 1 (o *Wa-like*), genotipo 2 (o *DS-1-like*) o *AU-1-like*, respectivamente, ha sido observada (Matthijnsen & Van Ranst, 2012). Estos tres genogrupos reflejan una diferencia total en su origen evolutivo y en la constelación genómica de sus cepas; y, en este sentido, un origen porcino, bovino y de perros/gatos ha sido propuesto para los genogrupos *Wa-like*, *DS-1-like* y *AU-1-like*, respectivamente (Matthijnsens et al., 2008; Nakagomi et al., 1990).

### **1.3.6 – Mecanismos de variabilidad genética y evolución**

Existe una gran diversidad genética de las cepas de RVA que circulan en la población humana, que es generada a través de diversos mecanismos de variabilidad genética y evolución que posee este virus, principalmente por la naturaleza de su genoma de ARN y segmentado, además de ser un virus con un gran reservorio animal.

En primer lugar, al ser un virus de genoma ARN y que por lo tanto su ARN polimerasa no posee capacidad correctora durante la replicación, la ocurrencia de mutaciones puntuales (mecanismo evolutivo descrito en inglés como *antigenic drift*) es frecuente en este virus (Taniguchi & Urasawa, 1995). Estas mutaciones puntuales se acumulan en el genoma, generando el surgimiento de linajes y sublinajes dentro de diferentes G- y P-genotipos. En algunos casos con un elevado número de linajes y sublinajes observados, como es el caso de G1, G9 y P[8] (Phan et al., 2007; Maranhao et al., 2012; da Silva et al., 2013). Actualmente, solamente se ha podido calcular la tasa

de evolución para los genotipos G9 y G12, en  $1,87 \times 10^{-3}$  y  $1,66 \times 10^{-3}$  (sustituciones nucleotídicas/sitio/año), respectivamente, valores similares a los obtenidos para otros virus ARN (Matthijnssens et al., 2010). En algunos casos, como es el caso del genotipo G3, que es el genotipo con el mayor rango de huéspedes de RVA (el cual ha sido detectado en: monos, conejos, cerdos, aves de corral, perros, gatos, caballos, ratones, ovejas y seres humanos), se observa que existen algunos linajes típicos de animales y otros típicos de humanos (Thongprachum et al., 2013).

En segundo lugar, al ser un virus con genoma segmentado, la ocurrencia de reestructuraciones de segmentos genómicos (*reassortment* en inglés, y mecanismo evolutivo descrito en el mismo idioma como *antigenic shift*), es frecuente en RVA. Los *reassortments* en virus segmentados ocurren cuando dos cepas distintas (humana-humana, humana-animal o animal-animal) infectan la misma célula, y durante el proceso de morfogénesis viral ocurre un intercambio de segmentos genómicos generando una progenie con segmentos de ambas cepas (virus reestructurado). Fueron descritos por primera vez por Matsuno y colaboradores (1980) que realizaron una coinfección en cultivo celular de rotavirus bovino (cepa Lincoln) y rotavirus simio (cepa SA11), obteniendo un virus reestructurado. Los *reassortments* parecen ser un evento frecuente en RVA, sin embargo, estudios recientes muestran que la mayoría de las variantes originadas por este mecanismo son sustituidas a lo largo del tiempo por cepas que presentan una constelación genómica que por algún motivo es dominante en la población viral (McDonald et al., 2009). La incidencia de los *reassortments* está influenciada por la frecuencia de coinfecciones en la población y la diversidad genética de los RVA circulantes (Ghosh & Kobayashi, 2011). En este sentido, los animales juegan un importante rol en la evolución de los RVA en humanos, ya que son reservorio de muchos genotipos que comúnmente no circulan en la población humana pero que potencialmente pueden “quebrar” la barrera inter-especie e infectar al humano, ya sea mediante una infección heteróloga (cuando un virión de origen animal es capaz de infectar al humano y provocar enfermedad), o mediante un evento de *reassortment* humano-animal; siendo la segunda opción la más frecuentemente observada. Tanto la infección heteróloga como el *reassortment* humano-animal, se han observado sobre todo entre los animales domésticos de producción pecuaria (como ser: bovinos, porcinos, ovinos y equinos, entre otros), así como los de estimación (mascotas tales como gatos y perros) y el humano. Existe en la actualidad, una amplia evidencia documentada de la ocurrencia de *reassortment* entre animales domésticos y humanos, y

en este sentido se ha observado la presencia de segmentos de origen animal en RVA humanos que infectan y causan enfermedad en el hombre. Hasta el momento han sido observados en RVA humanos segmentos genómicos de animales como: bovinos, porcinos, aves domésticas, perros, gatos y conejos. Estos eventos de *reassortment* humano-animal (así como las infecciones heterólogas) ocurren con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo donde generalmente: i) las condiciones de salud e higiene de la población son precarias, ii) las defensas inmunológicas de la población se encuentra debilitadas a causa de mal nutrición y/o infecciones concomitantes con otros agentes etiológicos, y iii) el estrecho relacionamiento que existe entre humanos y animales domésticos de producción debido al gran desarrollo de la actividad pecuaria en condiciones generalmente precarias de cría y transporte; lo que aumenta las chances de que ocurran infecciones mixtas, de un RVA humano y un RVA animal infectando un mismo individuo, y de esta forma aumentando la probabilidad de que estos eventos de *reassortment* se puedan llegar concretar (Estes & Greenberg, 2013). En este sentido, al igual que ocurre para el caso de los virus de Influenza A, es fundamental el monitoreo continuo de las cepas virales de RVA que circulan en animales, realizando una caracterización molecular profunda de estas, para así determinar los genotipos más prevalentes; sobre todo en aquellos países, como es el caso de Uruguay, en donde los animales se encuentran en estrecho contacto con la población humana a causa de una gran producción pecuaria.

Otro mecanismo de variabilidad genética observado en los RVA, es el rearme de segmento (*rearrangements*, en inglés). Los *rearrangements* son alteraciones en la longitud de los segmentos genómicos, ya sea debido a deleciones, inserciones o duplicaciones de los mismos. Estos eventos generalmente son evidenciados a través de un cambio en el patrón de migración del segmento que sufrió el *rearrangement* luego de una electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA) del ARN viral, o sea, un cambio en el perfil electroforético. Los *rearrangement* surgen por errores durante la replicación de un único segmento, los más frecuentemente observados en RVA son las duplicaciones parciales (*partial head-to-tail duplication*, en inglés), y han sido observados generalmente en los segmentos que codifican para NSP1, NSP3 y NSP5 (Estes & Greenberg, 2013). Estos eventos probablemente ocurran debido a una falla de la polimerasa viral, la cual vuelve sobre la hebra molde reiniciado la replicación del mismo segmento (Desselberger, 1996). Inicialmente solamente habían sido descritos en pacientes inmunodeprimidos (por ejemplo, paciente con HIV), o en cultivo celular a una

alta multiplicidad de infección o *MOI* (del inglés, *multiplicity of infection*, siendo esta el número promedio de virus por célula), pero recientemente, Schnepf y colaboradores (2008) describieron *rearrangement* en pacientes inmunocompetentes.

Por último, eventos de recombinación genética han sido observados, aunque con muy poca frecuencia en RVA. Al igual que el *reassortment*, para que ocurra recombinación genética debe ocurrir una coinfección de una misma célula por dos cepas virales diferentes de RVA. Existen algunos estudios mostrando recombinación entre genes de VP7 de diferentes G-genotipos y entre diferentes linajes del mismo G-genotipo (Parra et al., 2004; Phan et al., 2007a; 2007b; Martínez-Laso et al., 2009). Recientemente, mediante el análisis del genoma completo de casi 800 cepas de RVA, solamente se observó recombinación en 0,7% de ellas, por lo cual el autor concluye que este mecanismo de variabilidad genética no juega un rol importante en la evolución de los RVA (Woods, 2015).

### **1.3.7 – Patogénesis**

La infección provocada por RVA se limita a la mucosa gastrointestinal, aunque existen algunos relatos puntuales de infección sistémica con detección de RV en sangre, así como en otros órganos y tejidos (Estes & Greenberg, 2013).

La GA provocada por RVA tiene un período de incubación que varía entre 2 y 4 días, los síntomas generalmente empiezan abruptamente con fiebre y vómito, seguidos de diarrea acuosa que puede durar de 3 a 8 días (Staat et al., 2002; Lee et al., 2008).

La GA provocada por RVA es más frecuente en niños entre 3 y 36 meses de edad. Se cree que infecciones múltiples ocurren a lo largo de la vida y debido a la inmunidad adquirida en estos episodios los niños con edades más avanzadas y los adultos sufren de episodios menos graves y/o asintomáticos (Anderson & Weber, 2004).

Los conocimientos actuales que se tienen sobre la patogénesis de RVA se basan principalmente en estudios con modelos animales. Los RVA se replican en el epitelio del intestino delgado, más específicamente en los enterocitos maduros con función absorbiva que se encuentran en el tercio apical de las microvellosidades intestinales. La GA causada por RVA es multifactorial, y, por lo tanto, diversos mecanismos están involucrados (Estes & Greenberg, 2013).

Como fue mencionado en la sección 1.3.4, en la última etapa del ciclo de replicación, la progenie de rotavirus egresa de la célula muy probablemente por lisis celular. La lisis de los enterocitos provocada por rotavirus, disminuye la capacidad

absortiva del epitelio intestinal debido al daño provocando atrofia de las microvellosidades e hiperplasia de las criptas. Este daño del epitelio, provoca acumulación de líquido (que no es absorbido) en el lumen del intestino, lo que provoca diarrea osmótica y mal absortiva (Estes & Greenberg, 2013).

Además, la infección con rotavirus altera el metabolismo de las disacaridasas y otras proteínas de membrana de los enterocitos haciendo que estos pierdan su capacidad absortiva, lo que también provoca diarrea de tipo osmótica y mal absortiva. Esto ocurre al inicio de la infección, antes de la muerte celular. También se ha observado que antes de la muerte celular, durante la infección con RVA ocurre estimulación del sistema nervioso entérico (SNE) que induce diarrea tipo secretoria y aumento la movilidad intestinal (Franco et al., 2006).

Sumado a lo mencionado anteriormente, la proteína NSP4 de rotavirus se ha descrito como la primer enterotoxina de origen viral. Esta proteína por si sola es capaz de desencadenar diarrea de tipo secretora en ratones. Como se ha mencionado en la sección 1.3.4, esta proteína se inserta en la membrana de RE durante la morfogénesis viral. Se cree que esta proteína actúa como viroporina liberando el  $Ca^{2+}$  que se encuentra dentro de éste al citosol. El aumento de  $Ca^{2+}$  en el citosol altera el metabolismo de los enterocitos, lo que acaba provocando diarrea de tipo secretora. Además, la NSP4 (o un fragmento en forma de péptido de la misma: del aminoácido 112 al 175) es liberada de las células infectadas, actuando de forma parácrina sobre células vecinas (que aún no han sido infectadas por el virus), en las que provoca diarrea de tipo secretora por la vía de señalización intracelular de la Fosfolipasa C y la secreción de cloro (Estes & Greenberg, 2013).

Finalmente, recientemente se ha observado que el SNE puede ser activado mediante la liberación de serotonina de unas células del sistema entero-endocrino denominadas en inglés *enterochromaffin cells* al ser infectadas con rotavirus o estimuladas por NSP4. La serotonina liberada es capaz de: i) por un lado estimular el vómito mediante la activación del Núcleo del Tracto Solitario (área específica del tronco encefálico vinculada con la inducción de náuseas y vomito) a través de nervios vagos aferentes que se encuentran conectados a éste desde el SNE del intestino, y por otro lado, ii) es capaz de activar el SNE provocando diarrea (Hagbom et al., 2011; Estes & Greenberg, 2013).

### 1.3.8 – Tratamiento y prevención

El tratamiento de la GA provocada por rotavirus tiene como base reponer los fluidos y electrolitos. Para rehidratar al niño, se recomienda el uso de una Solución de Rehidratación Oral (SRO), que puede ser la fórmula de la OMS u otra fórmula comercial. En casos de niños que no estén completamente consientes o no puedan beber la SRO, se recomienda el uso de hidratación intravenosa, con la introducción de la SRO tan pronto como sea posible. La terapia nutricional e la asistencia médica son extremadamente importantes, ayudando a reducir la morbilidad y mortalidad causada por RVA. No existen antivirales disponibles para el tratamiento de las infecciones por RVA, y el uso de drogas con efecto antimovilidad (ej. Loperamida) o antisección (ej. Racecadotril) intestinal, o agentes de unión a toxinas, no se recomienda en casos de pacientes pediátricos (Chandarn et al., 2010).

Algunos estudios recientes han mostrado actividad antiviral de algunas drogas frente a los RVA (Rossignol et al., 2006; Teran et al., 2009; La Frazia et al., 2013; Shen et al., 2013, Dennehy, 2013). También se ha observado actividad antiviral de plantas medicinales contra la infección con RVA (Cecílio et al., 2012).

Solamente las mejoras en las condiciones sanitarias, como el tratamiento adecuado de los aguas residuales urbanas (que contienen heces de humanos y animales), así como el incentivo al amamantamiento materno precoz y exclusivo hasta el sexto mes de vida, el correcto lavado de manos, el consumo de agua potable y un sistema de salud adecuado; no son suficientes para la prevención y control de las infecciones por RVA. Esto es corroborado por la incidencia similar de las GA por RVA que existe en países desarrollados comparado con países en vías de desarrollo (Estes & Greenberg, 2013). Además, la infección natural no otorga protección completa contra la reinfección y la prevención de GA por RVA. La prevención durante los dos primeros años de vida es fundamental, pues es en este período de vida que ésta enfermedad es más grave. Debido a esto, la utilización de una vacuna segura y eficaz representa la mejor estrategia para disminuir los cuadros clínicos más graves de la GA provocada por RVA (Anderson, 2008).

Como fue mencionado al inicio, en el año 2009 la OMS recomendó la inclusión de la vacuna contra RVA en los PNGI de todos los países. Algunas vacunas ya fueron desarrolladas o están en fase de desarrollo (Yen et al., 2011). Solamente dos vacunas de uso oral (RV1 y RV5) están licenciadas para su uso a nivel mundial (Dennehy, 2015). La RV1 (de nombre comercial *Rotarix*<sup>®</sup>, y desarrollada por la compañía farmacéutica

*GlaxoSmithKline*, Rixensart, Bélgica) es una vacuna atenuada moNV alente de genotipo G1P[8] originada a partir de una cepa humana. La RV5 (de nombre comercial *Rotateq*<sup>®</sup>, desarrollada por la compañía farmacéutica *Merck and Co., Whitehouse Station, NJ*, Estados Unidos) es una vacuna pentavalente constituida por cepas de RVA genéticamente reestructuradas (*reassortment*), de origen humana y bovina, la cual está compuesta por cinco viriones reestructurados de la siguiente manera: i) cuatro viriones bovinos que posee el gen de VP7 humano de los genotipos G1, G2, G3 y G4, y ii) el quinto virión bovino posee el gen de VP4 humano de genotipo P[8] (Ruiz-Palacios et al., 2006, Vesikari et al., 2006). Las dos vacunas protegen contra los 5 genotipos más comunes de RVA que circulan mundialmente en humanos (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G2P[4]), y el impacto positivo de la introducción de estas vacunas ya fue demostrado en varios países del mundo (Chandran et al., 2010; Patel et al., 2012; Linhares & Justino, 2014; Dennehy, 2015).

Actualmente, 79 países en todo el mundo han incorporado una de las dos vacunas, RV1 o RV5, en sus PNGI. Muchos de estos países, en los que esta enfermedad genera un impacto mayor en la salud de su población y que además tienen bajos recursos económicos para costearse la introducción de la vacuna en sus PNGI, reciben apoyo económico de organizaciones internacionales como GAVI. En el caso de América del Sur, Uruguay es uno de los cuatro países que aún no ha introducido la vacuna en su PNGI (PATH, 2015). En Uruguay, ambas vacunas están disponibles y pueden ser compradas en las farmacias, pero a un costo elevado (aproximadamente US\$ 100). Siendo éstas vacunas generalmente recomendadas por médicos pediatras de las mutualistas privadas, donde son atendidos niños de la clase media y alta de nuestra población.

### **1.3.9 - Diagnostico**

La GA provocada por RVA no puede ser distinguida de aquellas provocadas por otros enteropatógenos virales, bacterianos o parasitarios a partir de las manifestaciones clínicas del paciente. Debido a esto, es fundamental un correcto diagnóstico del agente etiológico que está provocando la GA en el niño, para poder realizar el correcto tratamiento del paciente. Diversas técnicas de diagnóstico son empleadas en el caso de rotavirus, sobre todo para RVA debido a su importancia epidemiológica en humanos y animales de producción (Estes & Greenberg, 2013).

Inicialmente, en la década del 70, se utilizó la ME para diagnosticar casos de GA de etiología desconocida. Esta técnica es muy específica debido a la apariencia morfológica distintiva de los rotavirus, pero presenta varias desventajas: i) es poco sensible, ii) requiere el ojo entrenado de un operario especializado, iii) es una técnica laboriosa, y iv) se necesita un equipo muy costoso (Estes & Greenberg, 2013).

Una de las técnicas que más se usa de rutina en los laboratorios privados que ofrecen diagnóstico para los hospitales, son aquellas que se basan en ensayos inmunoenzimáticos (EIE) como por ejemplo el ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Los EIE como los ELISA y las inmunocromatografías en papel (ICP), utilizan anticuerpos poli o monoclonales que están generalmente dirigidos al antígeno común de grupo (o especie), la proteína VP6. Tienen la ventaja de que son sensibles y específicos, y hoy en día se han desarrollado *kit* comerciales en diferentes formatos validados, los cuales generalmente son muy fáciles de aplicar y ofrecen un diagnóstico rápido. Como desventajas, estos *kit* comerciales generalmente solo permiten la detección pero no la tipificación de la cepa de RVA. También existen técnicas de ELISA que permiten tipificar los serotipos G y P (WHO, 2009; Estes & Greenberg, 2013).

Otra técnica clásica de detección de rotavirus, es la EGPA de los segmentos genómicos de ARNdh. Es una técnica directa muy específica debido al electroferotipo típico de los rotavirus (Figura 1.3A), y ha demostrado ser tan sensible como la ME y el ELISA (Herring et al., 1982). A su vez, tiene la ventaja de que permite detectar diferentes grupos (o especies) de *Rotavirus* (Estes & Greenberg, 2013). En una modificación de esta técnica, cuyo nombre en inglés es *dot blot hybridization*, se realiza una hibridización *in situ* de ARNm marcados como sondas, con segmentos genómicos de rotavirus extraídos de una muestra clínica, desnaturalizados por temperatura, e inmovilizados en membranas de nitrocelulosa (Flores et al., 1982). Esta última técnica ha mostrado ser entre 10 y 100 veces más sensible que el ELISA, pero presenta como desventaja (al igual que la EGPA del ARNdh), que es una técnica laboriosa que requiere de un usuario altamente entrenado (Estes & Greenberg, 2013).

Con el surgimiento a mediados de los 90' de los métodos de RT-PCR para determinación de los genotipos G y P de RVA comunes en humanos (Gouvea et al., 1990; Gentsch et al., 1992; Das et al., 1994), la mayor parte de los estudios de epidemiología molecular de RVA se han centrado en la genotipificación a partir de los genes que codifican para estas dos proteínas con el fin de evaluar los G-tipos y P-tipos

predominantes en diferentes regiones del planeta (Santos & Hosino, 2005; Bányai et al., 2012).

A pesar de que existen los dos sistemas de clasificación binaria para RVA, para determinación de los serotipos (mediante EIE) y genotipos (mediante RT-PCR) “P” y “G”, el sistema de clasificación basado en las propiedades genéticas, para la determinación de genotipos, es el más aceptado y utilizado en todo el mundo por varios motivos: i) el método serológico basado en anticuerpos monoclonales (Mabs) ha mostrado tener reacción cruzada entre serotipos diferentes, sobre todo para la determinación de serotipos P, ii) los métodos serológicos requieren el suplemento continuo de Mabs y antisueros hiperinmunes de rotavirus, ambos producidos en animales, lo que va en contra de la tendencia actual del uso cada vez menos frecuente de animales en investigación, y iii) la RT-PCR ha demostrado ser más sensible que los ensayos serológicos y permite la opción de secuenciar el ADN viral de aquellos casos no-tipificables por RT-PCR (como ser genotipos emergentes o inusuales en humanos) o EIE. Debido a esto, la OMS recomienda el uso global de RT-PCR para la determinación de genotipos G y P de RVA (WHO, 2009).

Por último, cabe resaltar que también se han desarrollado métodos de detección de rotavirus por RT-PCR en tiempo real (Logan et al., 2006; Zeng et al., 2008). Esta técnica tiene la ventaja de que es más rápida que la RT-PCR convencional, y permite determinar la concentración viral en la muestra clínica. Por otro lado, presentan las desventajas de que no permite secuenciar el ADN de los casos positivos para ser utilizado en análisis de epidemiología molecular, y requiere de un equipo costoso.

### **1.3.10 – Epidemiología de RVA**

Los RVA poseen una amplia distribución mundial y son responsables de aproximadamente 40% de las hospitalizaciones debido a GA en niños menores de 5 años de edad en todo el mundo, independientemente del nivel económico. La incidencia de RVA es similar en países desarrollados y en países en vías de desarrollo, lo que demuestra que mejoras en las condiciones sanitarias no reduce significativamente la transmisión e incidencia de la enfermedad. Sin embargo, existe una clara diferencia en las tasas de hospitalizaciones y muertes, siendo éstas tasas mucho más elevadas en países en vías de desarrollo (Estes & Greenberg, 2013).

En el año 2004, eran estimadas aproximadamente 611.000 muertes anuales a causa de GAI provocada por rotavirus en todo el mundo, siendo que la enorme mayoría de estas ocurrían en países en vías de desarrollo (Parashar et al., 2006).

En los años 2006 y 2007, la Organización Panamericana de la Salud (OPAS) y el Grupo de Asesoría Estratégica de Especialistas en Inmunización (SAGE, de sus siglas en inglés: *Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Immunization*) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), declaran que la introducción de una vacuna de rotavirus era prioridad en las Américas, con la meta de prevenir las muertes y hospitalizaciones causadas por este virus. Por lo que dos vacunas fueron recomendadas: RV1 y RV5 (WHO, 2009).

Muchos países a nivel mundial, incorporaron una de las dos vacunas de rotavirus en sus Programas Nacionales Gratuitos de Inmunizaciones (PNGI) a partir de ese mismo año. Como es el caso de Brasil, que en marzo del año 2006 incorporó la *Rotarix*® en su PNGI, la cual ha mostrado muy buenos resultados reduciendo marcadamente las tasas de hospitalizaciones y muertes de niños a causa de GAI por rotavirus (y también GA de todas las causas), siendo esta reducción más acentuada en las regiones del país donde las condiciones sociales y económicas son más precarias (Norte y Nordeste), demostrando la importancia de la implementación de la vacuna en este país (Linhares & Justino, 2014).

Ya para el año 2011, una disminución marcada en la mortalidad a causa de este virus fue observada, provocando aproximadamente 196.000 muertes por año en todo el mundo, pero siendo aún responsables del 29% de las muertes anuales que se registran a nivel global por GAI de cualquier etiología (Walker et al., 2013).

Los RVA se transmiten comúnmente dentro y entre las familias (infecciones comunitarias), así como dentro de los hospitales, principalmente en los centros de cuidado infantil -pediatrías- (infecciones intrahospitalarias o nosocomiales). Su principal ruta de transmisión es la fecal-oral por el contacto persona-persona a través de: i) manos contaminadas (donde sobrevive por horas), y ii) objetos contaminados, como juguetes y superficies -fómites- (donde sobrevive por días) (Dennehy, 2015). Dentro de esta última, la transmisión intrahospitalaria de RVA ha sido reportada con frecuencia, con tasas de 27% y 32%, para países desarrollados y en vías de desarrollo, respectivamente (Fischer et al., 2004). Los RVA han sido detectados en aguas residuales urbanas tratadas y no tratadas, y brotes de GA de origen ambiental por RVA a través de transmisión hídrica han sido relatados (Hopkins et al., 1984; Timenetsky et

al., 1996; Kukkula et al., 1997; Villena et al., 2003a; Koroglu et al 2011). La transmisión de animales a humanos también ha sido reportada, ya sea mediante infecciones heterólogas o a través de eventos de *reassortment* humano-animal, pero son eventos raros (Estes & Greenberg, 2013). Por otro lado, también se especula que este virus podría tener una vía de transmisión aérea, debido a que su estacionalidad en países de clima templado es similar a virus respiratorios de gran importancia epidemiológica en niños menores de 5 años de edad (como Influenza A y el Virus Respiratorio Sincitial) (Dennehy, 2015).

Es importante destacar, que un número importante de niños pueden desarrollar una infección asintomática con RVA liberando el virus en sus heces. Sumado a esto, las personas que desarrollan sintomatología, empiezan a liberar virus infectivos en sus heces 2 días antes de empezar a manifestar los síntomas de GA, y hasta 10 días después de que se haya resuelto el cuadro de GA. Ambos factores representan fuentes importantes de transmisión del virus en la comunidad (así como nosocomial) (Ramani et al., 2010; Dennehy, 2015). De forma similar, los RVA pueden causar (aunque con menos frecuencia) infecciones sintomáticas y asintomáticas en niños mayores a 5 años de edad y en adultos, lo que también contribuye a su rápida distribución global (Anderson & Weber, 2004; Estes & Greenberg, 2013).

La GA provocada por RVA presenta un carácter epidémico en países de clima templado, con brotes y epidemias en los meses más fríos y secos del año. Por otro lado, en países de clima tropical presenta un carácter endémico, y los casos de GA por RVA ocurren de forma uniforme durante todo el año (Cook et al., 1990; Kane et al., 2004; Chandran et al., 2010).

### **1.3.10.1 – Epidemiología molecular de RVA en el mundo**

A partir del desarrollo a mediados de los 90 de las técnicas moleculares de detección y tipificación de RVA, principalmente las técnicas de RT-PCR Multiplex Semi-Anidada (RT-PCR MSA) para determinación de G- y P-tipos comunes en humanos (Gouvea et al., 1990; Gentsch et al., 1992; Das et al., 1994; WHO, 2009), la mayoría de los estudios de epidemiología desde entonces a la fecha se han centrado en la detección de los diferentes genotipos G y P que circulan en las diferentes regiones del mundo (Santos & Hosino, 2005; Banyai et al., 2012; Patton, 2012).

A pesar de actualmente un número importante de G y P[]-tipos han sido identificados en humanos, son 5 las combinaciones que comúnmente son detectadas en

todo el mundo, denominados *genotipos comunes en humanos*: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8]. Estos genotipos comunes en humanos son responsables por la mayoría de las infecciones por RVA (entre 75 y 80%), por lo cual la mayoría de los técnicas de detección y genotipado de RVA (RT-PCR MSA), así como las vacunas (RV1 y RV5), son desarrolladas en base a ellos. Sin embargo, este panorama puede cambiar dependiendo de la región geográfica, y *genotipos no-comunes en humanos* pueden tener una gran importancia epidemiológica en ciertas regiones, como ocurre en América del Sur, África y el Sudeste Asiático (WHO, 2009; Kirkwood, 2010; Linhares et al., 2011; Banyai et al., 2012; Patton, 2012).

Los estudios de epidemiología molecular realizados en todo el mundo han mostrado que: i) diferentes genotipos G y P pueden co-circular en una misma región y el genotipo prevalente en una región puede cambiar anualmente, ii) el genotipo prevalente en una región puede variar en intervalos de 1-3 años, probablemente como resultado de la acumulación progresiva de individuos inmunes, y iii) existe una mayor diversidad de genotipos detectados en países en vías de desarrollo que en países desarrollados, siendo detectados con más frecuencia los genotipos humanos no-comunes (Santos & Hosino, 2005; Parra, 2009; Bányai et al 2012).

Dentro de los genotipos no-comunes en humanos, podemos diferenciar 2 tipos: i) los *genotipos emergentes en humanos*, que son aquellos que en la actualidad no circulan a una frecuencia tan alta a nivel global como para ser considerados comunes pero han sido detectados en casi todas las regiones del planeta, y ii) los *genotipos atípicos o raros en humanos*, que son aquellos que presentan una frecuencia de detección muy baja y son generalmente de origen animal. Un ejemplo actual de un genotipo emergente, es el caso del genotipo G12P[8], que desde principios del año 2000 ha sido detectado en casi todas las regiones del planeta, en algunos lugares con una frecuencia muy elevada (Rahman et al., 2007). Debido a su historia y dinámica evolutiva similar (o igual) al genotipo común G9P[8], se especula que el genotipo G12P[8] podría convertirse en el sexto genotipo común en humanos (Matthijnssens et al., 2010). Por otro lado, dos ejemplos de genotipos atípicos o raros en humanos, son los genotipos G12P[9] y G3P[3]. El primero, es un genotipo que ha sido identificado en diferentes regiones del planeta pero de forma puntual y a una muy baja frecuencia. Este genotipo, a pesar de ser G12, presenta una constelación genómica totalmente diferente al G12P[8], *AU-like* y *Wa-like*, respectivamente. Solamente comparten el mismo Genotipo, pero de un linaje diferente, Linaje III y II, para G12P[8] y G12P[9],

respectivamente. Por lo que se cree que ambos tienen un origen evolutivo diferente, porcino y gato/perro, para G12P[8] y G12P[9], respectivamente (Rahman et al., 2007; Matthijnssens & Van Ranst, 2012). En el caso del segundo genotipo, el G3P[3], es comúnmente detectado en gatos y perros, pero su detección en humanos es muy poco frecuente (Matthijnssens et al., 2011b). Sin embargo, este genotipo ha sido esporádicamente detectado en niños con infección sintomática y asintomática con RVA (Aboudy et al., 1988; Li et al., 1993; Khamrin et al., 2006; Banerjee et al., 2007; De Grazia et al., 2007; Grant et al., 2011; Luchs et al., 2012).

### **1.3.10.2 – Epidemiología molecular de RVA en América Latina y el Caribe**

La epidemiología molecular de RVA viene siendo estudiada en América Latina desde mediados de los 90, siendo la mayoría de estos estudios realizados en países fronterizos o cercanos a Uruguay, como Brasil, Argentina y Paraguay (Linhares & Justino, 2014; Parra, 2009; Leite et al., 2008; Castello et al., 2004).

Castello y colaboradores (2004) revisaron estudios de epidemiología molecular realizados con RT-PCR para determinación de G- y P[]-tipos publicados desde año 1995 en 5 países de América Latina (Argentina, Brasil, Chile, México y Paraguay). Se evidencio que fueron analizadas muestras correspondientes al período de 1982 al 2000. Los autores reportaron entre otros datos interesantes que: i) los genotipos comunes en humanos en esa época: G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8], representaron 83% de las cepas detectadas, ii) El genotipo no-común G5 (de origen porcino) fue frecuentemente detectado en Brasil (tasa de detección entre 4 y 25%), iii) fueron encontradas varias cepas reestructuradas entre humanos y animales (más comúnmente de bovinos -G8, G10 y P[1]- y cerdos -G5-), y iv) el genotipo G12 fue detectado por primera vez en Argentina, representando la primera detección en América Latina.

En el año 2011, Linhares y colaboradores (2011), realizaron un abordaje similar al empleado por Castello y colaboradores (2004), abarcando en este caso cepas de RVA circulando en el período de 1977 al 2009 en América Latina y el Caribe. Entre otros datos importantes, los autores describen que: i) RVA fue responsable del 24,3% de los casos de GA, ii) los genotipos G más prevalentes fueron: G1 (34,2%), G9 (14,6%) y G2 (14,4%), iii) los genotipos P más prevalentes fueron: P[8] (56,2%) y P[4] (22,1%), iv) la circulación de G9 aumento de manera sustancial, coincidiendo con la disminución marcada de G5, v) fue detectado G12 por primera vez en Brasil y iv) la circulación de los de RVA luego de la implementación de la vacuna en el PNIG solo se pudo

evidenciar en tres estudios (dos en Brasil y uno en Nicaragua) donde G2P[4] fue detectado en 85% de las infecciones por RVA. Los autores discuten que este aumento en la frecuencia de detección de G2 (principalmente asociada a P[4]) coincidente con la introducción de la vacuna RV1 en Brasil y RV5 en Nicaragua, puede deberse a dos teorías: 1) una fluctuación cíclica natural del genotipo (debido a que en algunos países donde no se ha implementado la vacuna de RVA también se observó el aumento contemporáneo de G2), o 2) una presión selectiva por parte del sistema inmune debido a la vacunación (ya que en el caso de RV1 ésta es totalmente diferente -en todos sus genes- a G2P[4], y en el caso de RV5 esta es parcialmente diferente). Los autores se inclinan más por la primera teoría, aunque concluyen que es importante continuar con la vigilancia epidemiológica, así como realizar estudios antigénicos y de genómica en la era post-vacuna.

Por otro lado, recientemente, se ha observado en Brasil que la vacunación masiva con RV1 en la población ha generado la introducción de genes derivados de la vacuna en las cepas salvajes de RVA circulantes, mediante eventos de *Reassortment* (Rose et al., 2013).

### **1.3.11 – Rotavirus en Uruguay**

Como fue mencionado en la sección anterior, existen antecedentes importantes de epidemiología molecular en la región, principalmente en países vecinos a Uruguay. La incidencia de las GA provocadas por RVA en los diferentes países es estimada mediante redes de vigilancia epidemiológica y sistemas de registro en hospitales que aportan información vital respecto a esta enfermedad.

En Uruguay, las GA han sido estimadas como la segunda causa de mortalidad en niños pequeños, siendo responsable de un 10,2% de éstas (Ferrari et al., 2002). Sin embargo, pocos datos se han generado sobre la importancia de las GA provocadas por RVA en bebés y niños menores a 5 años de edad en nuestro país, debido a la falta de vigilancia basada en diagnósticos realizados en el laboratorio. Todos los estudios que se han realizado en Uruguay, fueron llevados a cabo en la ciudad de Montevideo, con la excepción de un único estudio realizado en la ciudad de Paysandú (Ribeiro et al., 1999). La enorme mayoría de ellos fueron publicados en revistas nacionales del ámbito médico. En este sentido, el RVA ha sido detectado desde la década del 80 (Ferrari et al., 1985; Hortal et al., 1986), siendo responsable de 18 a 45% de las hospitalizaciones por GA tanto en hospitales como en mutualistas privadas (Ramirez et al., 2001; Pérez et al.,

2007; 2011; Viettro et al., 2009), e inclusive siendo responsable de 40% de las GA por infecciones intrahospitalarias (Delfino et al., 2006). Sin embargo, en todos estos estudios los RVA fueron identificados a través de técnicas de EIE detectando el antígenos de RVA o la respuesta serológica del paciente (anticuerpos anti-RVA) mediante kit comerciales, así como la detección de RVA a partir de EGPA del ARNdh genómico. En ninguno de estos estudios fue determinado el G y/o P tipo, ni por serología, ni por técnicas moleculares.

En Uruguay, antes de la realización de este trabajo de tesis, solo tres estudios sobre RVA habían sido publicados en revistas internacionales indexadas, los cuales fueron realizados con pacientes de Montevideo. De estos cuatro estudios, solo en uno de ellos fue determinado el genotipo G de RVA, y dicho estudio fue realizado en muestras colectadas hace 15 años (Torres et al., 2001; De Sierra et al., 2002; Berois et al. 2003).

En un reporte recientemente publicado, se relata la circulación de RVA en muestras clínicas de niños con GA provenientes de hogares con alto nivel socioeconómico (Varela et al., 2015). En dicho estudio, RVA fue detectado por un kit basado en ICG, y junto con otros virus entéricos fueron los segundos agentes etiológicos encontrados con mayor frecuencia en las muestras (13%). Este valor podría estar subestimado, ya que, como fue mencionado anteriormente, el ICG es un método menos sensible para la detección de RVA que la RT-PCR.

Por lo tanto, antes de la realización de esta tesis, ningún estudio había sido realizado sobre la epidemiología molecular de los G- y P-tipos de RVA en casos clínicos de GA en Uruguay.

### **1.3.12 – RVA en aguas residuales urbanas**

Los rotavirus son excretados en las heces de individuos infectados en altas concentraciones (hasta  $10^{11}$  virus/gramo de materia fecal), tienen una baja dosis infectiva (entre 10 y 100 viriones infectivos), y su estructura molecular los hace muy estables en ambientes acuáticos por largos períodos de tiempo, así como muy resistentes a las condiciones adversas del medio ambiente (Graham, 1987; Ansari et al., 1991; Desselberger, 1999; Espinosa et al., 2008; Estes and Greenberg, 2013).

Los RVA han sido detectados en agua residual urbana desde inicio de los 80 (Steinmann, 1981; Hejkal et al., 1984; Bates et al., 1984; Bosch et al., 1988), y brotes de GA de origen ambiental por RVA a través de transmisión hídrica han sido relatados

(Hopkins et al., 1984; Timenetsky et al., 1996; Kukkula et al., 1997; Villena et al., 2003a; Koroglu et al 2011).

La caracterización molecular de RVA a partir de muestras ambientales comenzó a ser realizada a mediados de los 90, y actualmente existen varios estudios realizados en diferentes regiones del mundo, principalmente en países desarrollados (Le Guyader et al., 1994; Metcalf et al., 1995; Bosch et al., 1998; Villena et al., 2003b).

En América Latina, Brasil es el país que más ha contribuido a la investigación de RVA a partir de muestras ambientales (Mehnert and Stewien, 1993; Miagostovich et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Rigotto et al., 2010; Schlindwein et al., 2010; Fumian et al., 2010; 2011; Prado et al., 2011; Vieira et al., 2012), y Argentina, Venezuela y Bolivia están empezando sus investigaciones sobre RVA en área de la Virología Ambiental (Rodríguez-Díaz et al., 2009; Barril et al., 2010; 2015; Symonds et al., 2014; Prez et al., 2015).

Como fue mencionado anteriormente, en la sección 1.2, el agua residual contiene RVA de pacientes sintomáticos y asintomáticos de todas las edades, así como de animales domésticos (Metcalf et al., 1995; Bosch et al., 1998; 2008). Debido a esto, la caracterización molecular de RVA a partir de aguas residuales no brinda un panorama completo de la diversidad genética de las cepas virales que circulan en todos los individuos de la población. En este sentido, se han realizado estudios importantes de vigilancia ambiental de RVA describiendo genotipos G y P a partir de agua residual urbana, utilizando los mismos protocolos de RT-PCR MSA que son universalmente utilizados para la vigilancia epidemiológica a partir de muestras clínicas (Villena et al., 2003b; Miagostovich et al., 2008; Rodríguez-Díaz et al., 2009; Kamel et al., 2010; Fumian et al., 2011; Barril et al., 2015). Sin embargo, actualmente solo un estudio reciente describe los genotipos G y P a partir de agua residual a través de la secuenciación de ADN y análisis filogenético de las cepas de RVA. En este estudio, debido a este abordaje metodológico empleado, los autores pudieron comparar las secuencias de las cepas de RVA obtenidas a partir de agua residual con las obtenidas a partir de muestras clínicas contemporáneas de la misma región geográfica (Ruggeri et al., 2014).

#### **1.4 – Norovirus humanos**

Norovirus (NV) es el agente etiológico más importante de brotes de GA en humanos a nivel mundial, y, a diferencia de RVA, afecta a personas de todos los grupos etarios

(Green, 2013). Son responsables de más del 95% de los brotes de GA no bacterianos, y de aproximadamente 50% de todos los brotes de gastroenteritis en el mundo (Karst, 2010). En la actualidad, los NV se han establecido como la causa más común de casos esporádicos de GA en todos los grupos etarios, y la causa principal y más importante de enfermedades transmitidas por alimentos (Green, 2013; Barclay et al., 2014; Vinje, 2015). En el grupo etario de niños menores de 5 años de edad, NV es el segundo agente etiológico más importante de GAI a nivel mundial, luego de los RVA (Patel et al., 2008; Ramani et al., 2009). Sin embargo, recientemente, debido a la campaña mundial de vacunación contra RVA, NV está reemplazando rápidamente a los RVA como el principal agente etiológico de GAI en algunos países donde la vacunación contra RVA ha sido implementada a nivel nacional en sus PNGI (Ramani et al., 2014).

#### **1.4.1 - Historia**

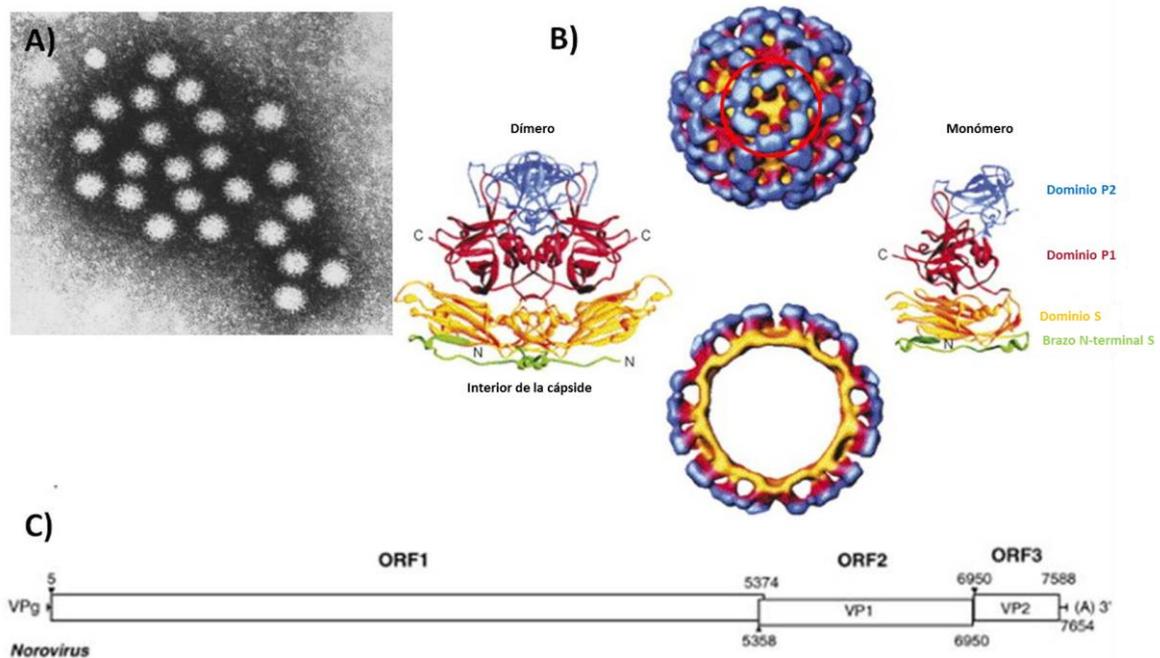
A partir de la década del 1940, los investigadores sugerían que los cuadros de GA no podían ser atribuidos exclusivamente a bacterias y protozoarios (Badger et al., 1956; Dingle et al., 1956). Para confirmar esa hipótesis, estudios clínicos fueron realizados con voluntarios adultos expuestos a filtrados de heces y vómitos de individuos con GA con etiología desconocida (Gordon et al., 1947). Sin embargo, luego de 20 años, aún continuaba desconocido el patógeno que causaba esos cuadros de GA no-bacteriano/no-parasitarios. En el año 1968, 50% de los alumnos y profesores de una escuela primaria de la ciudad de Norwalk, en Ohio, Estados Unidos, se enfermaron, manifestando un cuadro clínico caracterizado por vómito, náuseas, dolores abdominales y diarrea, síntomas semejantes a una enfermedad descrita en 1929 como “enfermedad de los vómitos de invierno” (en inglés, *winter vomiting disease*) (Zahorsky, 1929). Ninguna bacteria o parásito fue detectado, sospechándose de un virus como el agente etiológico de ese brote. Kapikian y colaboradores (1972), mediante el uso de la inmunomicroscopía electrónica (IME) visualizaron partículas de 27 nm de diámetro (Figura 1.6A), a partir de heces de voluntarios que fueron expuestos a filtrados de heces derivadas de pacientes del brote de Norwalk. Complejos Antígeno-Anticuerpo fueron formados por la precipitación de las partículas virales mediante la utilización del suero de un paciente que desarrolló la enfermedad luego de la exposición al filtrado. Estos complejos fueron denominados *Norwalk-like viroses (NLV)*, y representan los primeros virus descritos como agentes etiológicos de GA.

Los *NLV* fueron clasificados como un género dentro de la familia *Caliciviridae* luego de la caracterización de su genoma viral completo, donde fueron identificadas características de su estructura genómica compartidas con otros virus pertenecientes a esta familia (Jiang et al. 1993; Green et al. 2000). La denominación *Caliciviridae*, deriva de la palabra “calix” en latín, que significa “caliz”, debido a las depresiones visualizadas por criomicroscopía electrónica (CME) en la superficie de la cápside de este virus (Figura 1.6B) (Parasad et al., 1999). Posteriormente, el género *NLV* fue renombrado como *Norovirus*, teniendo al virus *Norwalk* como cepa prototipo del género (ICTV, 2015).

La ausencia de un cultivo celular y un modelo animal para la propagación de los NV humanos, resultó en la indisponibilidad de métodos diagnósticos capaces de detectar este virus. Fue solo a partir de la década de 1990, con el avance de la biología molecular, principalmente después de desarrollo de la PCR, que fue posible realizar la caracterización de su genoma y el establecimiento de ensayos moleculares para la detección de este virus a partir de muestras clínicas (Jiang et al. 1990, 1992).

#### **1.4.2 – Estructura del virión**

El virión de NV carece de envoltura lipídica, y su cápside es de simetría icosaédrica, con un diámetro de 26 a 37 nm, un número de triangulación igual a 3, mostrando 32 depresiones grandes con forma de “caliz” en su superficie (cuando se observa por CME) (Figura 1.6B, parte de arriba). La cápside está organizada en 90 capsómeros formados por dímeros de la proteína VP1 mayoritaria de cápside (Figura 1.6B, derecha). Ésta proteína, tiene dos dominios principales unidos por un dominio visagra: i) el dominio S (del inglés, *Shell*) que es más interno y es el responsable por forma la icosaédrica de la cápside viral, y ii) el dominio P (del inglés, *protruding*) que forma las espículas virales (Figura 1.6B, izquierda). El dominio P de VP1 está subdividido en dos subdominios, el subdominio interno P1 y el externo P2 (Figura 1.6B, izquierda). La proteína VP2 minoritaria de cápside también está presente en el virión, estando involucrada en el aumento de la expresión de VP1 y en la estabilización de sus dímeros, también se sospecha que pueda estar involucrada en la encapsidación del genoma viral (Prasad et al., 1999; Tan & Jiang, 2007; Karst, 2010).

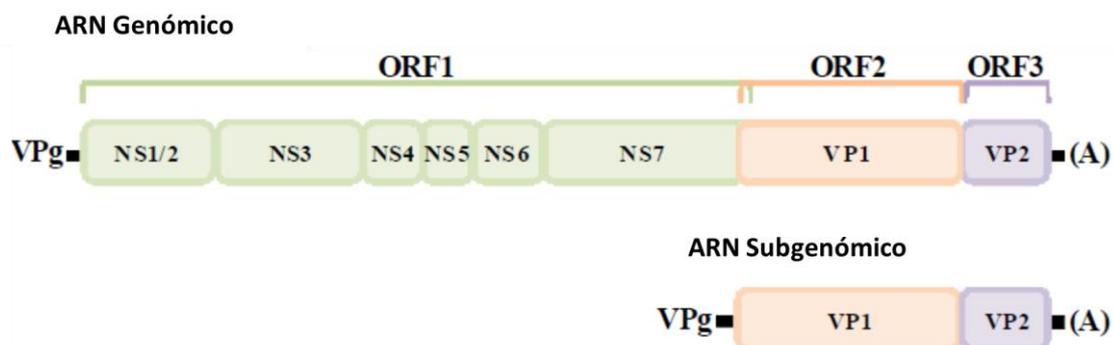


**Figura 1.6 – Estructura del virión y organización genómica de Norovirus.** A) Micrografía electrónica de un preparado conteniendo viriones de NV, obtenida mediante Inmunomicroscopía Electrónica (Adaptada de *Kapikian, 2000*). B) Arriba, reconstrucción tridimensional (3D) de un virión de NV obtenida a partir de análisis por Criomicroscopía Electrónica de preparados conteniendo partículas virales de NV, el círculo rojo muestra la proyección en forma de “caliz” de la superficie del virión; Abajo, corte transversal de figura 3D diferenciando los distintos dominios y subdominios de la proteína mayoritaria de la cápside, VP1: en amarillo el dominio “S”, en rojo el subdominio “P1” y en azul el subdominio “P2”; Derecha, esquema de la estructura terciaria de un monómero de la proteína VP1 mostrando los diferentes dominios, subdominios y estructuras secundarias de esta proteína, el código de colores se corresponde con el de las figuras 3D de Arriba y Abajo, y se muestra el dominio “N” en la base del monómero en color verde; Izquierda, esquema de la estructura cuaternaria de VP1, formando un dímero compuesto de dos monómeros de VP1, los códigos de colores se corresponden con el esquema del monómero de la Derecha (Adaptada de *Tan & Jiang, 2007*). C) Dibujo esquemático representando un genoma completo de NV, en el que se identifican las 3 ORF con las posiciones nucleotídicas donde inicia y finaliza cada una (se puede ver que las ORF1 y 2 están levemente solapadas por menos de 20 pb), la VPg en el extremo 5’ y la cola poli-A en el extremo 3’ (representada como “(A)”) (Adaptada de *Green, 2007*).

### 1.4.3 – Genoma y proteínas virales

El genoma de NV está formado por una ARN de hebra simple de polaridad positiva de aproximadamente 7,7 Kb. Esta organizado en 3 ORFs (ORF1, 2 y 3), regiones no codificantes en los extremos 5’ y 3’, y una cola poli-A en el extremo 3’. Estos virus también poseen un ARN subgenómico de aproximadamente 2,3 Kb que contiene las ORFs 2 y 3, además, éste ARN subgenómico tiene una región no codificante y una cola poli-A, ambos en su extremo 3’. Tanto en la extremidad 5’ del

ARN genómico como del ARN subgenómico, existe una proteína VPg unida covalentemente, que se sospecha está asociada a la síntesis de nuevas moléculas de ARN viral (Figura 1.7). La ORF1 posee aproximadamente 5 kb de largo, representando cerca del 65% del largo total del genoma, la cual es clivada proteolíticamente en las siguientes proteínas: 1) *p48* (o *NS2*), que regula el transporte de vesículas e inhibe la expresión de proteínas de superficie de la célula hospedera, y también se sospecha que da soporte para la maquinaria de replicación; 2) *p40* (o *NS3* o *NTPasa*), que es una nucleosido trifosfatasa; 3) *p22* (o *NS4*), que inhibe la secreción de proteínas de la célula hospedera, y se sospecha que también pueda estar involucrada en la formación del complejo de replicación; 4) *VPg* (o *NS5*), que es una proteína que actúa como iniciador de la replicación viral (luego de su uridilización), y también actúa en el reclutamiento de factores de inicio de la traducción; 5) *3CLpro* (o *NS6*), que es una proteasa que cumple la función de clivar la poliproteína generada a partir de la traducción del ORF1 generando las diferentes proteínas no-estructurales; y 6) *RdRp* (o *NS7*), que es la ARN polimerasa ARN dependiente que replica el genoma viral y genera la VPg uridilada. Y, finalmente, las ORF2 y 3 codifican para las proteínas estructurales VP1 y VP2, respectivamente (Jiang et al., 1990; 1993; Green et al., 2001; Belliot et al., 2003; Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Karst., 2010).



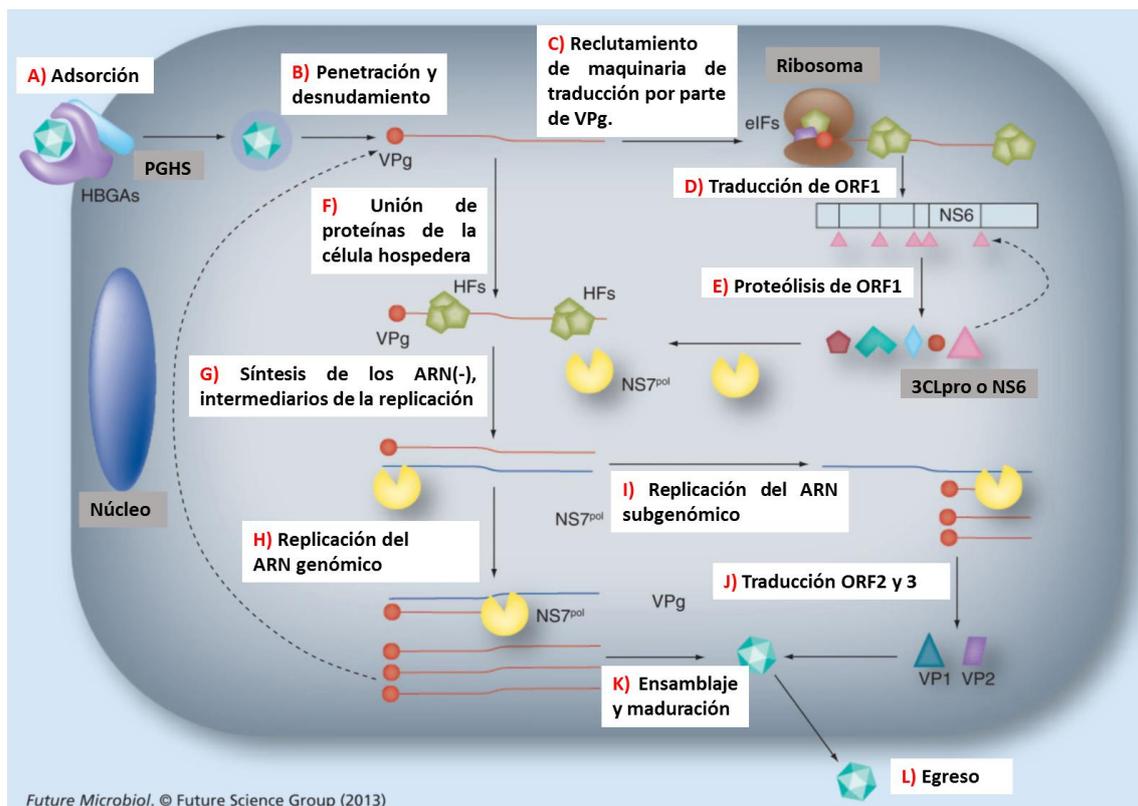
**Figura 1.7 – Representación esquemática de la organización genómica de Norovirus.** El genoma de NV contiene tres ORFs, uno codifica para una poliproteína que dará origen a siete proteínas no estructurales (en verde), otro codifica para la proteína mayoritaria de la cápside VP1 (en anaranjado) y otro codifica para la proteína minoritaria de la cápside VP2 (en morado). Existe una corta región de solapamiento entre los ORFs 1 y 2, de aproximadamente 16 pb de longitud. Un ARN subgenómico que contiene los ORFs 1 y 2 se produce durante la replicación. Este ARN subgenómico actúa como ARNm para la producción de las proteínas estructurales (VP1 y VP2), y al igual que el ARN genómico, está unido covalentemente a VPg por su extremo 5' y posee una cola polia-A en su extremo 3' (Adaptado de Karst, 2010).

#### 1.4.4 – Replicación viral

Actualmente, se conoce poco sobre el ciclo de replicación viral de los NV humanos, debido a la ausencia de un sistema de cultivo celular eficiente o un modelo animal, que posibiliten la replicación viral, *in vitro* o *in vivo*, respectivamente. La mayoría de la información que se tiene sobre su replicación, ha sido gracias al conocimiento de las estrategias de replicación de otros virus humanos ARN de polaridad positiva, y sobre todo gracias a estudios realizados con calicivirus felinos y NV murinos, para los cuales si existe cultivo celular (Green et al., 2007; 2013).

La adsorción viral de los NV humanos se realiza mediante la unión del subdominio P2 de la proteína VP1 (receptor viral) a los antígenos del grupo histo-sanguíneo o *HBGAs* (del inglés, *Histo blood group antigen*) (receptor celular), que son carbohidratos complejos unidos a proteínas (glicoproteínas) o lípidos (glicolípidos) de la superficie celular de eritrocitos y células epiteliales de las mucosas de humanos (Tan & Jiang, 2005). También participan en la adsorción como receptores celulares, los Proteoglicanos Heparán Sulfatos (PGHS), que son un tipo de proteínas de membrana altamente glicosiladas con un tipo especial de polisacárido denominado glicosaminoglicanos (GAG); siendo el Heparán Sulfato un tipo específico de GAG (Figura 1.8, parte A) (Green, 2013). El virión adsorbido penetra en la célula, por un mecanismo aún desconocido, y luego de su desnudamiento el genoma es liberado al citosol celular (Figura 1.8, parte B). En primera instancia, el ARN genómico (ARNg) liberado, recluta factores de inicio de la traducción (como los eIF3 y eIF4F) mediante la interacción de éstos con su VPg en el extremo 5', lo que permiten el ensamblado de la maquinaria de traducción celular sobre el ARNg/VPg (Figura 1.8, parte C). Luego, ocurre la traducción de la poliproteína codificada por la ORF1 mediante un mecanismo de traducción independiente de CAP (Figura 1.8, parte D). Dicha poliproteína es clivada por la 3CLpro (y sus precursores) dando origen a las proteínas virales no-estructurales (Figura 1.8, parte E) (SosNV tsev et al., 2003; Arias et al., 2013). Las proteínas virales no-estructurales promueven la replicación del ARNg a mediante la proteína VPg que es uridilada, actuando de esta forma como iniciadora (o *primer*) de la replicación. De la misma forma que ocurre con otros virus ARN(+), la replicación viral está asociada a la membrana de la célula hospedera (Green, 2013). Se ha observado que la unión de factores de la célula hospedera (como: *La protein*, *DDX3*, *hnRNP A1* y *PTB*) al ARNg(+) es un paso crítico para que ocurra una replicación viral eficiente (Figura 1.8,

parte F) (Arias et al., 2013). La ARN polimerasa viral (RdRp o NS7pol) cataliza la síntesis de los intermediarios de replicación, ARN(-) (ARN de polaridad negativa), a partir de los ARNg(+), asistida por la p40 (NS3 o NTPasa) que es un homólogo de la helicasa (Figura 1.8, parte G). A partir de los ARN(-), serán sintetizadas copias de ARNg (Figura 1.8, parte H) y ARN subgenómico (ARNsg) (Figura 1.8, parte I) (Neill & Mengeling, 1988; Gutiérrez-Escolano et al., 2000). A partir de los ORF2 y 3 del ARNsg son traducidas las proteínas estructurales VP1 y VP2, respectivamente (Figura 1.8, parte J) (Arias et al., 2013; Green, 2013). No se conoce bien los procesos de ensamblado y maduración de los viriones de la progenie viral -morfogénesis viral- (Figura 1.8, parte K), así como tampoco se conoce bien cuál es el mecanismo de egreso del virus (Figura 1.8, parte L). Sin embargo, la apoptosis inducida por cambios en la membrana celular fue propuesta como uno de los mecanismos que facilitan el egreso del virus (SosNV tsev et al., 2003; Green et al., 2007). Más recientemente, se ha propuesto la lisis celular como mecanismo de egreso de este virus (Green, 2013).



**Figura 1.8 - Ciclo de replicación viral de Norovirus.** Las etapas del ciclo están indicadas con las letras rojas de A) a L). Por descripción de cada etapa referirse al texto. PGHS, Proteoglicano Heparán Sulfato. HGBAs, antígenos del grupo histo-sanguíneo. eIFs, factores eucariotas de inicio de la traducción.

3CLpro o NS6, proteasa viral. NS7pro, ARN polimerasa viral (RdRP). HFs, proteínas de la célula hospedera. Adaptada de Arias y colaboradores (2013).

Por último cabe resaltar que muy recientemente, Jones y colaboradores (2014), han demostrado que los NV humano infectan linfocitos B humanos *in vitro*, y posiblemente *in vivo*. Los autores también evidenciaron que para que ocurra la infección de linfocitos B por NV humanos, ésta debe realizarse en presencia de bacterias entéricas (comunes de la flora intestinal) que expresen *HBGAs*. Con base en estos hallazgos, estos investigadores han desarrollado un sistema de cultivo para NV humanos en linfocitos B, lo que podría permitir en el futuro conocer más sobre el ciclo de replicación viral de este virus.

#### **1.4.5 – Clasificación**

Los *Norovirus* (NV) constituyen un género dentro de la familia *Caliciviridae* (ICTV, 2015). Debido a que solo muy recientemente, un sistema de cultivo para los NV humanos ha sido descrito (Jones et al., 2014; 2015), este virus no ha sido aún subdividido en serotipos. Por lo cual, actualmente, el género *Norovirus* es subdividido genéticamente en 7 *Genogrupos* (GI a GVII), en base a el análisis de la secuencia completa de aminoácidos del ORF1 que codifica para la proteína mayoritaria de cápside VP1 (Figura 1.9) (Zheng et al., 2006; Tse et al., 2012; Vinjé, 2015). De éstos 7 genogrupos, solamente se han identificado en humanos cepas pertenecientes a tres de ellos: GI, GII y GIV. Los genogrupos GI y GII son responsables de la mayoría de los casos de GA en humanos, mientras que el GIV raramente es detectado. Estos genogrupos son a su vez subdivididos en genotipos (Figura 1.9). Tomando en cuenta todos los genogrupos, podemos identificar al menos 40 genotipos diferentes dentro de los NV. Actualmente, nueve genotipos han sido descritos dentro del GI, y 22 en el GII, todos ellos infectan a humanos con excepción de tres genotipos dentro del GII que solamente infectan porcinos (GII.11, GII.18 y GII.19). El genogrupo GIV, está subdividido en 2 genotipos, de los cuales el GIV.1 ha sido detectado en humanos y el GIV.2 en especies de felinos y caninos (Martella et al., 2009). Los virus pertenecientes al genogrupo GII son los más frecuentemente detectados en casos de GA en humanos (aproximadamente 90%), mientras que los que se encuentran dentro del genogrupo GI causan el 10% de los casos restantes (Green, 2013; Ahmed et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la gran diversidad genética observada entre los NV humanos, las cepas

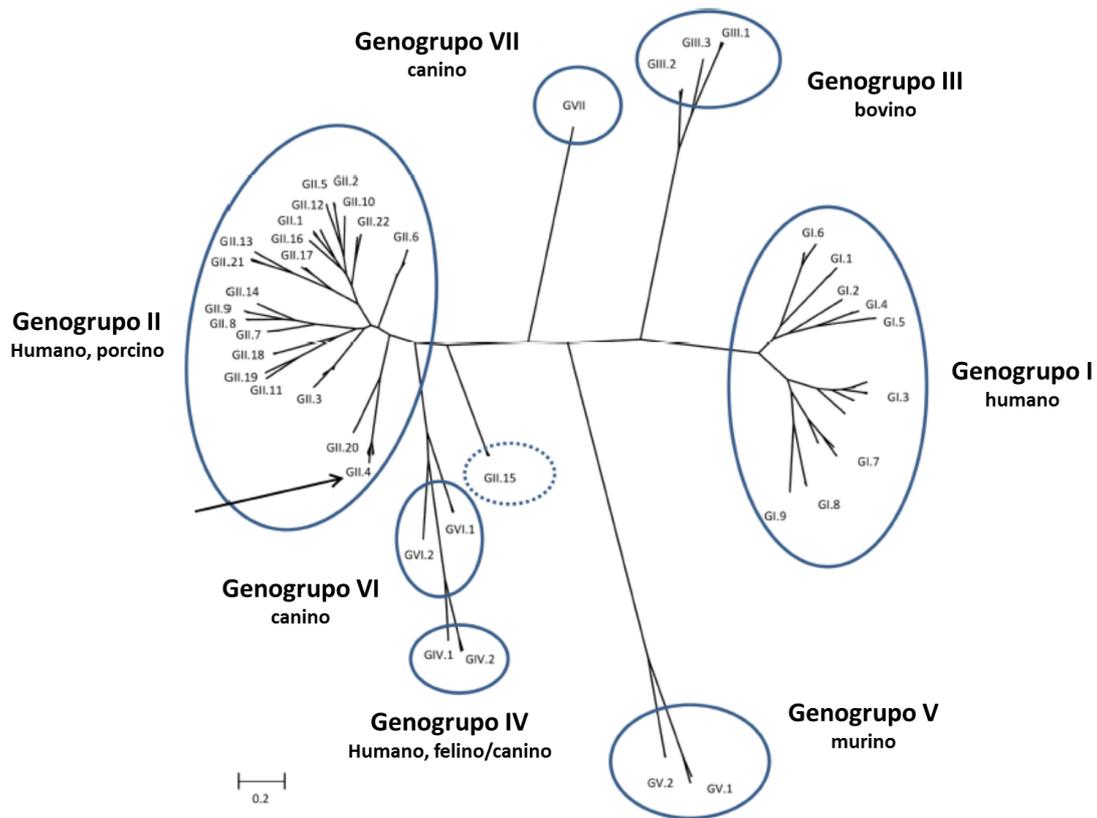
pertenecientes a un único genotipo, GII.4, son responsables de más del 80% de los casos y brotes de GA en humanos en todo el mundo (Kroneman et al., 2008; Green, 2013; Vinje, 2015). Debido a la gran diversidad genética observada en GII.4, han sido identificadas *variantes* pandémicas dentro este genotipo, las cuales han emergido cada 2 o 3 años desde mediados de 1990, remplazando la variante pandémica anterior, pero no las cepas endémicas (Siebenga et al., 2009; Vinjé, 2015). Las variantes pandémicas de GII.4 son denominadas especificando la ubicación y el año en la cual fueron identificadas por primera vez, y las que han surgido hasta ahora son: i) US95/96 en 1995, ii) Farmington Hills en 2002, iii) Hunter en 2004, iv) Den Haag en 2006, v) New Orleans en 2009, y vi) Sydney en 2012. El surgimiento de cada nueva variante de GII.4, esta generalmente asociado, pero no siempre, al aumento en el número de brotes de GA por NV (Siebenga et al., 2007; 2009; Kroneman et al., 2008; Bull et al., 2011; Tran et al., 2013; Eden et al., 2014; Ramani et al., 2014; Vinjé, 2015).

En cuanto a la nomenclatura empleada para las cepas de NV, en primera instancia los genogrupos se denominan con la letra “G” seguida del número de genogrupo con número romano (del I al VII); por ejemplo, el genogrupo dos se escribe como: *GII*. En el caso de los genotipos descritos dentro de cada genogrupo, estos son descritos seguido al número romano del genogrupo con números arábigos, separados por un punto; por ejemplo: el genotipo cuatro del genogrupo dos se describe como: *GII.4*. En el caso de GII.4, las diferentes variantes pandémicas se describen a continuación especificando el nombre y año en el que fue identificada por primera vez la misma; por ejemplo, la última variante, que fue identificada por primera vez en la ciudad de Sydney (Australia) en el año 2012, se describe como: *GII.4 Sydney 2012*. Más recientemente, Kroneman y colaboradores (2013) propusieron una nueva nomenclatura para describir cada cepa de NV de la siguiente manera: Genogrupo/código de dos letras del nombre común de la especie en la que fue identificada (por ejemplo, *Hu* para humanos)/Código ISO de dos letras del país en el que fue identificada (por ejemplo, *AU* para Australia)/año en el que fue aislada la cepa/genogrupo, genotipo (primero el de ORF1 -precedido de una *P*- y segundo el de ORF2, si se conocen ambos) y en el caso de GII.4 el nombre de la variante/nombre común de la cepa dado por el investigador. Por otro lado, debido a que la recombinación entre el ORF1 y 2 es un evento frecuente en NV, y que el genotipado se puede realizar utilizando secuencias nucleotídicas parciales de ambas ORFs (más comúnmente se utiliza la ORF2), este sistema de nomenclatura contempla esta situación. A modo de ejemplo, se describe una cepa de la que se conoce

el genotipo de ORF1 y ORF2 (a), y una cepa de la que se conoce solo el genotipo de ORF2 (más común) (b):

- a) *GII/Hu/US/2010/GII.P12-GII.12/HS206*
- b) *GII/Hu/AU/2012/GII.4 Sydney/Melbourne456*

Por último, basado en el análisis de secuencias nucleotídicas de las regiones C y D, para muchos genotipos se han descrito *subclusters*, alguno con hasta cuatro, como es el caso de GI.3. Éstos se denominan con letras minúsculas, en este caso: GI.3a a GI.3d. Debido a esto, secuencias de referencias de estos *subclusters* deben ser incluidas en el análisis filogenético para realizar un correcto genotipado de la cepa (Vinjé, 2015).



**Figura 1.9 – Clasificación de Norovirus.** La clasificación de NV en 7 genogrupos (GI a GII) se basa en el análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos completa de VP1. La construcción filogenética del árbol de esta figura fue realizada con 105 cepas prototipos seleccionadas de diferentes regiones del mundo, las cuales representan la diversidad genética espacial y temporal de NV. En cada genogrupos se indica el nombre común de la/s especie/s que infecta/n. El GII.15, que ha sido solo detectado en humanos, se propone como un nuevo genogrupos debido a la divergencia que presenta en este análisis con respecto a los otros genotipos de GII, y a los otros genogrupos (línea punteada). Se marca con una flecha la ubicación de los GII.4, que son los responsables de la mayoría de las infecciones de NV en todo el

mundo. La barra-escala de 0,2 en la parte inferior de la figura refleja el número de sustituciones aminoacídicas por sitio. (Adaptada de Vinjé, 2015).

#### 1.4.6 – Mecanismos de variabilidad genética y evolución

Dos mecanismos principales de variabilidad genética y evolución de los NV han sido descritos: i) La mutación puntual, principalmente por sustituciones nucleotídicas (mecanismo denominado en inglés, *antigenic drift*), y ii) La recombinación genética, mediante recombinación homóloga (mecanismo denominado en inglés *antigenic shift*). En el caso del *antigenic drift*, este se observa principalmente en términos sustituciones nucleotídicas que llevan a cambios aminoacídicos, sobre todo los que ocurren en los sitios antigénicos localizados en la subunidad P2, de la proteína VP1 mayoritaria de cápside. Por otro lado, la recombinación genética (*antigenic shift*) que ha sido observada entre genotipos diferentes y también dentro de un mismo genotipo, ocurre principalmente en la región de solapamiento entre el ORF1 y el ORF2 (White, 2014). Esta región de solapamiento entre el ORF1 y el ORF2, tiene una longitud aproximada de 30 pb, siendo muy conservada entre los NV humanos GI y GII, la cual se sospecha forma una estructura secundaria de ARN en forma de *stem loop*, que jugaría un papel significativo para que los eventos de recombinación ocurran con mayor frecuencia en esa región (Bull et al., 2005; Kao et al., 2001; Miller et al., 1985; Morales et al., 2004; Pletneva et al., 2001).

En el caso del *antigenic drift*, se han estimado tasas de evolución similares -e inclusive mayores- a otros virus ARN de evolución muy rápida, en base a análisis de coalescencia a partir de secuencias nucleotídicas de NV detectados en pacientes con GA (Victoria et al., 2009; Fioretti et al., 2014), así como en NV detectados a partir de muestras ambientales (Fernández et al., 2012). Por otro lado, en el caso de *antigenic shift*, la recombinación homóloga inter e intragenotípica en la región de solapamiento del ORF1 con el ORF2, ha sido ampliamente documentada en NV de los genogrupos GI, GII y GIII (Katayama et al., 2002, 2004; Han et al., 2004; Oliver et al. 2004; Bull et al., 2005; 2007; Fumian et al., 2012), así como también, ha sido demostrada experimentalmente *in vitro* utilizando NV murino (Mathijs et al., 2010).

Como fue mencionado anteriormente, el 80% de los casos y brotes de GA en humanos en todo el mundo se deben a infecciones de cepas del genotipo GII.4, habiendo sido responsable de seis pandemias de NV desde mediados de 1990 hasta ahora. Cada una de estas pandemias ha sido asociada al surgimiento de una nueva

variante de GII.4, las cuales han emergido cada 2 o 3 años reemplazando la variante pandémica anterior (Ramani et al., 2014). De estas seis cepas pandémicas de GII.4, se ha observado que las primeras cuatro probablemente evolucionaron de cepas previas no-pandémicas de GII.4 a través de *antigenic drift* del dominio P de VP1 (Bull et al., 2010; Donaldson et al., 2010; Debbink et al., 2012). Por otro lado, las dos cepas pandémicas más recientes, *New Orleans 2009* y *Sydney 2012*, han evolucionado a partir de una combinación de ambos mecanismos, *antigenic drift* en la cápside y *antigenic shift* entre diferentes cepas de GII.4 (recombinación intragenotípica) en la región de solapamiento ORF1-ORF2 (Eden et al., 2013). Por lo tanto, se podría decir que el sistema inmune actúa seleccionando las cepas pandémicas de NV GII.4 mediante ambos mecanismos de evolución, *antigenic drift* y *antigenic shift*. Permitiendo de esta forma, el remplazo de la variante viral dominante circulante, cada aproximadamente 3 años, con una nueva variante capaz de re-infectar al hospedero que había sido previamente infectado con la variante anterior (White, 2014).

#### **1.4.7 – Patogénesis y manifestaciones clínicas**

Debido a que solo muy recientemente, un sistema de cultivo para los NV humanos ha sido descrito (Jones et al., 2014; 2015), y a la ausencia actual de un modelo animal que posibilite la infección con NV humanos, todo el conocimiento adquirido sobre su patogénesis proviene de observaciones clínicas, y de estudios histológicos y bioquímicos realizados con voluntarios humanos infectados (Blacklow et al., 1972; Schreiber et al., 1974; Troeger et al., 2009). Recientemente, estudios con bovinos, suinos y murinos han auxiliado en el entendimiento de la patogénesis de los NV (Cheetham et al., 2006; Mumphrey et al., 2007; Troeger et al., 2009). NV infecta enterocitos maduros del tercio apical de las microvellosidades del intestino, y probablemente egresa de estos por lisis celular luego de cumplir su ciclo de replicación (Green, 2013). La infección con NV ocurre en el intestino delgado provocando un achatamiento rápido y reversible de las vellosidades y un acortamiento de las microvellosidades, provocando lesiones en la mucosa que resultan en la pérdida de la capacidad absorptiva de este órgano, desencadenando así en el surgimiento de diarrea. También se ha observado edema celular e hiperplasia de la cripta (Blacklow et al., 1972; Schreiber et al., 1973; Schreiber et al., 1974; Troeger et al., 2009). Por otro lado, algunos estudios sugieren que NV también induce apoptosis celular en humanos suinos y murinos, debido a que se han observado cambios celulares típicamente asociados a

este mecanismo como: i) un aumento en la vacuolización citoplasmática, ii) condensación y compactación de la cromatina en la periferia del núcleo, iii) segmentación del núcleo, y iv) una reducción en la expresión de las proteínas que forman las uniones estrechas intercelulares (*Tight junctions*) del epitelio intestinal (Cheetham et al., 2006; Mumphrey et al., 2007; Troeger et al., 2009).

Los NV tienen un período muy corto de incubación que varía de 24 a 48hrs. Las principales manifestaciones clínicas son la diarrea y el vómito, que pueden venir acompañados de náuseas, dolor abdominal, cefalea, fiebre y dolor muscular. Siendo por causa de los últimos dos síntomas, que a la enfermedad provocada por NV también se la denomina “gripe estomacal” (*stomach flu*), por compartir esta sintomatología del cuadro gripal. La GA provocada por NV generalmente es auto-limitada y las manifestaciones clínicas se resuelven en un promedio de 48hrs (Glass et al., 2009; Karst, 2010; Green, 2013). La diarrea es más prevalente en niños menores de un año de edad, en tanto que el vómito es más frecuente en pacientes mayores de cinco años de edad (Rockx et al., 2002; Lopman et al., 2004). El grupo de riesgo lo representan: i) los lactantes, ii) niños menores de cinco años de edad, iii) adultos mayores a 65 años, iv) pacientes desnutridos, e v) individuos inmunosuprimidos, inmunocomprometidos o inmunodeficientes; en los cuales las manifestaciones clínicas pueden ser más graves y duraderas, aumentando la probabilidad de un cuadro de deshidratación grave que eventualmente puede provocar internación y muerte (Zintz et al., 2005; Mattner et al. 2006; Kirkwood & Streitberg, 2008; Harris et al. 2008; Glass et al., 2009; Westhoff et al., 2009; Green, 2013).

Por último, la patología de NV humanos también está influenciada por la capacidad que tienen estos de unirse a los HGBAs como receptor celular para la adsorción viral, y su vinculación con la susceptibilidad o resistencia innata del individuo a la infección con este virus. La síntesis de los HGBAs es controlada por la enzima fucosiltransferasa (FUT1, 2 y 3). Éstas enzimas son codificadas por los genes polimórficos ABO, *Lewis* y *secretor*. Los individuos que poseen el gen FUT2 salvaje (cerca del 80% de la población mundial), son considerados secretores y son susceptibles a la infección por NV. Por otro lado, los individuos con el gen FUT2 nulo (cerca del 20% de la población mundial) son no-secretores y son resistentes a la infección por NV (Lindesmith et al., 2003).

#### **1.4.8 – Tratamiento y prevención**

El tratamiento para la GA provocada por NV, es el mismo que para la GA provocada por RVA, ya que se trata de tratamientos sintomáticos basados en la reposición de los electrolitos debido a la deshidratación que provoca la diarrea y el vómito (Glass et al., 2009). Ningún antiviral contra NV humano ha sido desarrollado en la actualidad, aunque se ha observado que el tratamiento con Interferon y Ribavirina inhiben de forma eficaz la replicación de este virus (Chang et al., 2007).

La prevención de los brotes de GA provocados por NV depende de la identificación del modo de transmisión. De forma general, la interrupción del modo de transmisión se da por la implementación de medidas de control de la contaminación de alimentos y agua, manteniendo al mismo tiempo una higiene adecuada, sobre todo por un correcto lavado de manos, en los manipuladores de alimentos y reduciendo la propagación del brote por el contacto persona-persona. Debido a la excreción del virus en la fase asintomática luego de que se resuelven los síntomas, se recomienda la exclusión de manipuladores de alimentos que estuvieron enfermos mediante la implementación de políticas de licencias médicas pagas por un período mínimo de 3 días luego de la resolución de los síntomas. Lo mismo aplica para adultos y niños, que deben ser excluidos de sus locales de trabajo y de la escuela, respectivamente, por el mismo período de tiempo. Luego de episodios de diarrea y vómito, las superficies contaminadas deben ser desinfectadas con una solución de hipoclorito a 5-25% o 1000 a 5000 p.p.m. (partes por millón) (CDC, 2011). De la misma forma, luego de un brote o un epidemia prolongada, interrumpir el funcionamiento de establecimientos como cruceros, hoteles, campamentos y restaurantes es esencial para evitar la exposición de una nueva población susceptible (Patel et al., 2009). Actualmente, existen metodologías que permiten la detección de NV directamente de aguas o alimentos contaminados, auxiliando en la identificación y eliminación de la fuente de contaminación, y de esta forma previniendo nuevas infecciones (Katayama et al. 2002; Fumian et al. 2009). La higiene de las manos es fundamental para prevenir la transmisión persona-a-persona, principal vía de transmisión de este virus, siendo relatada como responsable de hasta 88% de los brotes por NV (Green, 2013). Los NV son transferidos de forma eficaz de individuo con manos contaminadas por hasta siete superficies limpias diferentes (Barker & Vipond, 2004). Es de suma importancia la desinfección periódica de superficies hospitalarias, así como evitar el tránsito por áreas con pacientes inmunocomprometidos (sobre todo adultos mayores) luego de tratar pacientes con GA por NV, intensificando

la higiene de manos y utilizando siempre EPIs (Equipamientos de Protección Individual) (CDC, 2011).

Debido a la ausencia de un sistema de cultivo para NV humanos, el desarrollo de vacunas para NV humanos se basa en la utilización de sistema de expresión de proteínas recombinantes, en los cuales se expresa la proteína VP1 de NV humanos *in vitro*, la cual espontáneamente se ensambla formando “partículas similares a virus” o VLPs (del inglés, *Virus-like particles*). Las VLPs son morfológica y antigénicamente indistinguibles de la cápside normal de NV, y desde su descubrimiento han sido usadas como candidatas para el desarrollo de vacunas contra el NV humanos (Jiang et al., 1992). Estudios pre-clínicos muestran que las VLPs son inmunogénicas cuando se administran por vía parenteral, oral o intranasal, y que anticuerpos séricos y de mucosa son inducidos (Ball et al., 1999; Estes et al., 2000; Tacket et al., 2003; El-Kamary et al., 2010). La estrategia actual en el desarrollo de vacunas de NV humanos consiste en el uso de vacunas multivalentes conteniendo VLPs con cepas de GI y GII, principalmente GI.1 y GII.4, respectivamente. Planteándose a su vez, que las mismas deberán ser reformuladas cada 2 o 4 años, sobre todo debido al surgimiento de nuevas variantes pandémicas de GII.4 con antigenicidad diferente, y a los posibles cambios en las cepas epidemiológicamente importantes (Debbink et al., 2014). En la actualidad ya se están realizando ensayos de fase uno con este tipo de vacunas, las cuales han mostrado buenos resultados reduciendo la diarrea y vómito a causa de NV, siendo a su vez seguras e inmunogénicas (Treanor et al., 2014; Bernstein et al., 2015). Se estima que en un período de 5 a 10 años estas vacunas puedan estar disponibles en el mercado (Debbink et al., 2014).

#### **1.4.9 – Diagnostico**

La IME puede ser utilizada para la detección de NV, pero presenta baja sensibilidad (106 viriones/gramo de materia fecal), no siendo aplicable en el diagnóstico de rutina y en estudios epidemiológicos (Atmar & Estes, 2001); debido a esto y a otras desventajas que ya fueron mencionadas previamente en la sección 1.3.9.

Mediante la inoculación de animales con VLPs, se han podido obtener anticuerpos poli y monoclonales que han permitido el desarrollo de diferentes EIE. Tiene la ventaja de ser una técnica rápida (entre 60 y 90 minutos), siendo algunas inmunocromatografías (ICG) disponibles en formato comercial muy rápidas, ofreciendo resultados en 15 minutos, además puede ser utilizada por el personal de salud en el

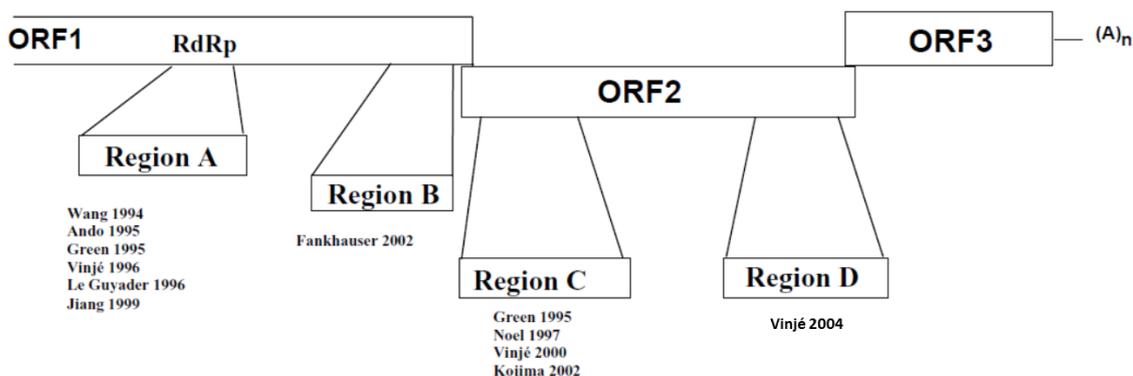
lugar donde está ocurriendo el brote como primera técnica de *screening* (Vinjé, 2015). También es una técnica específica, aunque debido a la gran variabilidad genética de NV, mismo utilizando diferentes VLPs en simultaneo esta técnica puede dar resultados falsos negativos (Jiang et al. 2000; Richards et al. 2003). Como desventajas, presentan una sensibilidad baja de, 57–76% y 35–52%, para EIE y ICG, respectivamente (Vinjé, 2015).

La RT-PCR es la técnica más ampliamente utilizada para la detección de NV a partir de muestras clínicas (materia fecal, vómito y suero) de casos esporádicos y brotes, así como de muestras ambientales: comida, aguas y fómites (Vinjé, 2015). Su sensibilidad y especificidad es mayor que la IME, EIE e ICG. Los EIE pueden ser utilizados en primera instancia para el *screening* de brotes de GA por NV, pero, sin embargo, deben ser complementados con el análisis por RT-PCR de las muestras negativas por EIE (Bruin et al. 2006; Castriciano et al. 2007).

Diferentes regiones del genoma han sido utilizadas para la detección y genotipado de NV humanos mediante RT-PCR. Generalmente, en primera instancia se hace un *screening* por PCR direccionadas a las regiones A o B de la ORF1 (Figura 1.10), debido a que esta región es conservada entre las diferentes cepas de NV (Beuret et al. 2002; Boxman et al. 2006; La Rosa et al. 2007). Para realizar el genotipado de NV humanos, los protocolos de RT-PCR son direccionados a las regiones C y D localizadas en la ORF2 (Figura 1.10), ya que estas regiones permiten luego, mediante secuenciación y análisis filogenético del producto de PCR, asignar los genotipos específicos de GI y GII (Kojima et al. 2002; Vinjé et al. 2004; Kitajima et al., 2010). Siendo la región C más robusta que la región D, debido a que la segunda requiere una temperatura de hibridación de cebadores (o *annealing*) más baja dando como resultado amplificaciones inespecíficas, y también está localizada sobre una región más variable que la región C (Vinjé, 2015). Por otro lado, también han sido desarrollados protocolos de RT-PCR direccionados a las regiones A y B de la ORF1 que permiten genotipar NV, sin embargo los basados en las regiones C y D son los más ampliamente utilizados a nivel mundial para estudios de epidemiología molecular (Vinjé et al., 2004; Vinjé, 2015). Un herramienta *on-line* denominada *Norovirus Genotyping Tool* ha sido desarrollada y está disponible de manera gratuita para ser utilizada, la cual, al cargarle la secuencia parcial de NV determina el genotipo de ORF1 y/o el de ORF2, así como también la variante de GII.4 (Kroneman et al., 2011).

La qRT-PCR, se ha establecido como la técnica *gold standard* para detección de NV a partir de muestras clínicas y ambientales (Vinjé, 2015). Está, presenta las mismas ventajas y desventajas que las técnicas desarrolladas para RVA, mencionadas anteriormente, las cuales son inherentes a la metodología en sí. En el caso de NV humanos, éstas han sido desarrolladas en formato mono y multiplex para detección de GI y GII basadas en la amplificación de la región altamente conservada de solapamiento entre el ORF1 y el ORF2 (Kageyama et al., 2003; Pang et al., 2005).

Por último, más recientemente han sido desarrolladas, y están disponibles en el mercado, plataformas de diagnóstico molecular para detectar múltiples patógenos entéricos (virus, bacterias y parásitos) a partir de la misma muestra. Tres de ellas, que han sido aprobadas por la FDA de estados Unidos (*US Food and Drug Administration*), son: i) la *xTAG GPP* (Luminex Corporation, Toronto, Canada), ii) el *FilmArray GI Panel* (BioFire Diagnostics Inc., Salt Lake City, UT, USA), y iii) el *Verigene Enteric Pathogens Test (EP)* (Nanosphere, Northbrook, IL, USA). Tienen la ventaja de que permiten detectar entre 9 y 23 patógenos gastroentéricos diferentes a partir de una misma muestras (dependiendo de la plataforma), y la desventaja de que requieren un equipo muy costoso, así como un *kit* específico de cada equipo (Vinjé, 2015).



**Figura 1.10 – Representación esquemática del genoma de norovirus con las localizaciones de las regiones más utilizadas para detección y genotipado por RT-PCR cualitativa.** Debajo de cada región se muestran referencias de trabajos en los que se han desarrollado protocolos de RT-PCR direccionados a esa región. (Tomado de *Vinjé et al., 2004*).

#### 1.4.10 – Epidemiología

A diferencia de otros virus entéricos, los NV afectan a individuos de todas las edades. Sin embargo, su incidencia (así como los casos de mayor gravedad) es mayor en lactantes, niños menores de 5 años de edad, adultos mayores y pacientes

inmunocomprometidos (Pang et al., 2000; Rockx, et al., 2002; Glass et al., 2000; Hall et al., 2011; Green, 2013).

NV es la causa más importante de brotes de GA de origen viral (más del 90%) a nivel mundial, y las primera o segunda causa de casos esporádicos de GA. Este virus provoca en países desarrollados aproximadamente 900.000 casos de GA en la comunidad y 64.000 hospitalizaciones en niños menores de 5 años de edad. Por otro lado, en lo que se refiere a países en vías de desarrollo, los NV provocan aproximadamente 1.1 millones de hospitalizaciones y 218.000 muertes al año en niños menores de 5 años de edad. Siendo que la prevalencia de la GA graves en niños por NV tiene una media de 12% en ambos (Patel et al., 2008; 2009). Según datos más recientes publicados por Ahmed y colaboradores (2014), basados en estudios de epidemiología molecular realizados en todo el mundo desde el 2008 al 2014, la prevalencia de NV en casos de GA fue de 18%. Observándose diferencias en la prevalencia de NV entre casos de GA que ocurren en la comunidad, pacientes no-hospitalizados y pacientes hospitalizados, de 24%, 20% y 17%, respectivamente. También fueron observadas diferencias en la prevalencia de este virus entre países desarrollados y en vías de desarrollo con baja mortalidad, y países en vías de desarrollo de mortalidad elevada, de 19%, 20% y 14%, respectivamente.

La importancia de los NV en los brotes de GA se debe a su gran transmisibilidad. Ésta está asociada, entre otros factores, a la gran capacidad infectiva que tiene este virus, ya que se ha relatado que la probabilidad media de desarrollar la infección por una única partícula viral es de 50% (Teunis et al. 2008). Sumado a esto, las personas infectadas pueden eliminar el virus en la materia fecal luego de la resolución de los síntomas por más de 20 días, originando una fuente de contaminación para posibles nuevos casos de GA (Rockx et al. 2002).

NV tiene una ruta de transmisión fecal-oral. La transmisión persona-a-persona se describe como la principal vía de transmisión tanto en brotes como en casos esporádicos de GA. Siendo importantes también la transmisión de NV a través de fómites, aerosoles, agua y alimentos. (Phillips et al., 2010; Verhoef et al., 2010; Lopman et al., 2012; Green, 2013).

La infección causada por la ingesta de agua ocurre por la contaminación de la fuente de agua de consumo o de diferentes cuerpos de aguas usados para actividades recreacionales, siendo las inundaciones una vía de contaminación frecuente en estos últimos (Cannon et al., 1991; Kukkula et al., 1999; Lopman et al., 2002; Hoebe et al.

2004; Hewitt et al., 2007; Okoh et al., 2010; Arvelo et al., 2012). Por otro lado, la infección a través de alimentos se da a través del consumo principalmente de mariscos, frutas y verduras que se consumen crudos o semicocidos. Éstos son contaminados a través de la irrigación de campos con agua contaminada (frutas y verduras), cultivo de mariscos (principalmente bivalvos) en aguas contaminadas y por la manipulación de los mismos por parte de personal infectado que no realiza una higiene adecuada (sobre todo de manos) (Daniels et al. 2000; Widdowson et al. 2005; Boxman et al. 2006; Schmid et al. 2007; Bosch et al., 2008; Maunula et al., 2009; Vivancos et al., 2009; Wadl et al., 2010; Yu et al., 2010; Sarvikivi et al., 2012).

La mayoría de los brotes de GA provocados por NV se dan principalmente en locales confinados y con grandes aglomeraciones tales como: cruceros marítimos (Isakbaeva et al., 2005; Wikswow et al., 2011), hoteles *resorts* (Doménech-Sánchez et al., 2011; Arvelo et al., 2012), escuelas (CDC, 2008; Kimura et al., 2012), hospitales (Georgiadou et al., 2011; Rhinehart et al., 2012), universidades (CDC, 2009), guarderías (Götz et al., 2002; Gallimore et al., 2004; Akihara et al., 2005), geriátricos (Lai et al., 2012; Thouillot et al., 2012; Trivedi et al., 2012) y campamentos militares (Wadl et al., 2010; Yap et al., 2012). Muchos de estos brotes son vinculados a vómito de personas infectadas, siendo este un síntoma típico de las GA por NV (observado en más del 50% de los casos) y una importante vía de transmisión (Caul, 1994; Lopman et al., 2002, 2011a; Thornley et al., 2011).

El patrón de estacionalidad para los NV para países de clima tropical aún no está bien esclarecido, ocurriendo casos de GA causados por NV durante todo el año. Por otro lado, en países de clima templado, se observan picos de detección sobre todo en los meses más fríos y secos del año (Patel et al., 2009; Matthews et al., 2012).

Finalmente destacar, que debido a la campaña mundial actual de vacunación contra RVA, el NV está reemplazando rápidamente a los RVA como el principal agente etiológico de GAI en algunos países donde la vacunación contra RVA ha sido implementada a nivel nacional en sus PNGI (Koo et al., 2013; Payne et al., 2013; Becker-Dreps et al., 2014). Este reemplazo también ha sido observado en muestras ambientales de agua residual (hospitalaria y comunitaria) de Nicaragua, donde una elevada prevalencia de NV comparada con una baja prevalencia de RVA ha sido determinada luego de la introducción de la vacuna de RVA en el país (Bucardo et al., 2011).

La transmisión zoonótica no se ha observado en el caso de NV, por lo que los animales domésticos que también pueden ser infectados por este virus, como perros, gatos, cerdos y bovinos, no serían reservorios naturales de nuevas cepas de NV con potencial de infectar al humano. Sin embargo, algunos estudios recientes sugieren que la transmisión zoonótica podría eventualmente ocurrir, debido a que se ha podido infectar experimentalmente porcinos y bovinos con cepas de NV humanos. Y estos animales infectados experimentalmente, no solo manifiestan sintomatología de GA, sino que también excretan el virus humano en sus heces por hasta 4 días luego de resuelta la enfermedad (Cheetham et al., 2006; Souza et al., 2008). Muy recientemente, se ha planteado que el reservorio natural de cepas emergentes de NV en humanos serían individuos inmunocomprometidos (que pueden excretar el virus en sus heces por hasta años), así como individuos desnutridos y adultos mayores (Karst & Baric, 2015).

#### **1.4.10.1 – Epidemiología molecular a nivel mundial**

Los estudios de epidemiología molecular de NV humanos, sobre todo en pacientes pediátricos, han revolucionado nuestro entendimiento sobre la epidemiología de este virus en los últimos 20 años. Según datos recientes, en primera instancia, estos estudios revelan la gran co-circulación de diferentes genotipos de GI y GII en los casos esporádicos de GA en niños. Sin embargo, el GII es el más prevalente siendo responsable de 96% de los casos esporádicos de GA. Dentro de GII, el genotipo GII.4 de ORF2 es el más prevalente en los casos esporádicos de GA (70%), seguido del genotipo GII.3 de ORF2 (16%) y del genotipo GII.b de ORF1 (14%). Entre las cepas recombinantes de NV humanos (ORF1/ORF2), los genotipos GII.b, GII.12 y GII.4 de ORF1 combinados con GII.3 de ORF2, fueron responsables del 19% de todas las cepas genotipadas (Tran et al., 2013). Por otro lado, una prevalencia muy similar ha sido observada en el caso de brotes de GA por NV. En donde se observa una prevalencia de GII (~90%) sobre GI (~10%), siendo también los genotipos GII.4 (~75%) y GII.3 (~15%) los más prevalentes (Green, 2013). La importancia epidemiológica en humanos del surgimiento de variantes pandémicas dentro GII.4 cada dos o tres años desde mediados de 1990, y su vinculación con el aumento en el número de brotes, ya ha sido ampliamente descrito a lo largo de esta sección (ver secciones 1.4.5 y 1.4.6) (Siebenga et al., 2007; 2009; Kroneman et al., 2008; Bull et al., 2011; Tran et al., 2013; Eden et al., 2014; Ramani et al., 2014).

Según un estudio reciente realizado por Matthews y colaboradores (2012), en el que se evaluó la forma de transmisión y frecuencia de GI y GII en brotes de GA provocados por NV, el GI estaría más asociado a la transmisión por aguas de por otras vías de transmisión, así como el GII estaría más asociado a la vías de transmisión a través de alimentos y contacto persona-a-persona. Estos resultados corroboran estudios previos que demuestran que partículas virales de GI son menos estables en superficie que las de GII (Liu et al., 2009), y que, por otro lado, partículas de GI son más estables en agua que las de GII (Charles et al., 2009; Seitz et al., 2011).

Por último, el otro genogrupo de NV que infecta humanos, el GIV, también ha sido detectado en muestras clínicas de humanos (de brotes, casos esporádicos y geriátricos), así como de animales y del ambiente, aunque con una prevalencia notoriamente menor que GII y GI (Vinjé & Koopmans, 2000; Fankhauser et al., 2002; Iritani et al., 2002; Lindell et al., 2005; Zintz et al., 2005; La Rosa et al., 2008, 2010; 2012; Kitajima et al., 2010, 2011; Eden et al., 2012).

#### **1.4.10.2 – Epidemiología molecular en América Latina**

Al igual que en el resto del mundo, en el caso de América Latina, los NV están involucrados con altas tasas de infección en casos esporádicos y en brotes, así como en niños y adultos, variando entre 12 y 53%. También han sido observados los genogrupos GI y GII, sin embargo en GII es el más prevalente con una frecuencia de hasta 88% de los casos positivos, y una gran diversidad de genotipos co-circulantes ha sido detectada (O’Ryan et al., 2000; Bereciartu et al., 2002; Martinez et al., 2002; Vidal et al., 2005; Bucardo et al., 2008, 2011; Gomes et al., 2008).

En el caso de Brasil, el conocimiento sobre la epidemiología de este virus es vasto y abarca todas las regiones del país: i) Norte (Gabbay et al., 1994; Aragão et al., 2010; Fumian et al., 2012; Aragão et al., 2013; Fumian et al., 2013), ii) Noreste (Parks et al., 1999; Campos et al., 2008; Nakagomi et al., 2008; Xavier et al., 2009), iii) Centro-Oeste (Cardoso et al., 2002; Borges et al., 2006; Andreasi et al., 2008; Ferreira et al., 2010), iv) Sudeste (Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Gallimore et al., 2004; Barreira et al., 2010; Morillo et al., 2010; Ferreira et al., 2008; 2010; 2011; 2012; Fioretti et al., 2014), y v) Sur (Georgiadis et al., 2010; Fioretti et al., 2011). En el caso del estudio realizado por Fioretti y colaboradores (2011), fueron analizadas 90 muestras de diarrea provenientes de pacientes con GA de todas las regiones del Brasil, en donde el 71% de las muestras fueron positivas para GII, y fueron

detectados los siguientes genotipos: GII.4, GII.6, GII.7, GII.12, GII.16 y GII.17. En este país, se observada a partir de estos estudios, i) una prevalencia alta de NV en pacientes pediátricos con valores similares e inclusive mayores que RVA, ii) una gran diversidad de genotipos circulantes, siendo el GII el más frecuente, y sobre todo GII.4, iii) una prevalencia alta en individuos de diferentes grupos etáneos, y iv) no se observa un patrón de estacionalidad marcada, siendo detectado en meses secos o húmedos en diferentes estudios, e inclusive sin estacionalidad aparente durante periodos largos de 5 a 6 años.

Pero NV ha sido detectado en casos de GA de otros países de la región como Argentina (Martínez et al., 2002; Gómez et al., 2007; 2008), Paraguay (Galeano et al., 2013), Chile (O’Ryan et al., 1999; 2009; 2010; Vidal et al., 2005; 2006; Díaz et al., 2012; Montenegro et al., 2014), Perú (Yori et al., 2009; Gonzaga et al., 2011; Rivera et al., 2011; Saito et al., 2014; Ballad et al., 2015), Ecuador (Lopman et al., 2015; Gatañaduy et al., 2015) y Venezuela (Pujol et al., 1998; Rodríguez-Guillén et al., 2005; González et al., 2011). De estos estudios se puede extraer de forma general que NV: i) fue detectado en lactantes, niños pequeños y adultos, ii) fue detectado en casos esporádicos y en brotes, iii) su prevalencia varió entre 13 y 51% (este último en niños con HIV), iv) el GII fue prevalente, siendo GII.4 frecuentemente detectado, y v) su prevalencia en niños con GA fue en algunos casos inclusive mayor que la detectada para RVA.

En el caso de Uruguay, solo un reporte recientemente publicado relata la circulación de NV en muestras clínicas de niños con GA provenientes de hogares con alto nivel socioeconómico (Varela et al., 2015). En dicho estudio NV fue detectado por un kit basado en ICG, y junto con otros virus entéricos fueron los segundos agentes etiológicos encontrados con mayor frecuencia en las muestras (13%). Este valor podría estar subestimado, ya que, como fue mencionado anteriormente, el ICG es el método que presenta menos sensibilidad para la detección de NV. Por lo tanto, ningún estudio ha sido actualmente reportado sobre la epidemiología molecular de NV en casos clínicos de GA en Uruguay.

#### **1.4.11 – Norovirus humanos en aguas residuales**

Como ya fue mencionado los NV humanos, al igual que los otros virus entéricos, se transmiten a través del agua y alimentos contaminados. Siendo la fuente más importante de contaminación en ambos, el agua residual urbana, sea ésta tratada o no,

ya que se ha observado que los virus resisten a los tratamientos aplicados en éstas aguas (Bosch et al., 2008; Kitajima et al., 2010; 2012; Mans et al., 2013).

Por otro lado, como también se observa para otros virus entéricos, el estudio de las cepas de NV que circulan en el agua residual nos permite determinar las cepas que circulan en la población que está generando esas aguas en esa localidad geográfica y en esos periodo de tiempo, detectándose virus de pacientes sintomáticos como asintomáticos (Iwai et al. 2009; Kremer et al. 2011; Bucardo et al., 2011; Rajko-Nenow et al. 2013). En este sentido, diferentes estudios de detección y caracterización molecular de NV humanos a partir de agua residuales urbanas han sido realizados en la región. Al igual que en los estudios de epidemiología molecular, Brasil ha sido el país que más ha investigados este virus a partir de aguas residuales (Victoria et al., 2010a; 2010b; Prado et al., 2011; Fumian et al., 2013; Teixeira et al., 2015). En estos estudios: i) fueron detectados cepas de GI y GII así como sus genotipos en muchos de ellos, ii) los NV fueron detectados en agua residual con y sin tratamiento, iii) tanto de aguas residuales comunitarias como de hospitales, y iv) se detectó por primera vez en Brasil el GIV.1. Por otro lado, Argentina también han realizado estudios de caracterización molecular de NV humanos a partir de aguas residuales, con un interesante abordaje metodológico en donde no solo fueron caracterizadas molecularmente las cepas virales circulantes, sino que también se realizaron estudios filodinámicos y filogeográficos a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas. Mediante los cuales, los autores reafirman la importancia de estudiar éstas muestras ambientales como reflejo de la epidemiología molecular en la población (Fernández et al., 2011; 2012).

En Uruguay, antes de la realización de este trabajo de tesis, no existían reportes sobre el estudio de NV a partir de aguas residuales.

### **1.5 - Astrovirus humanos**

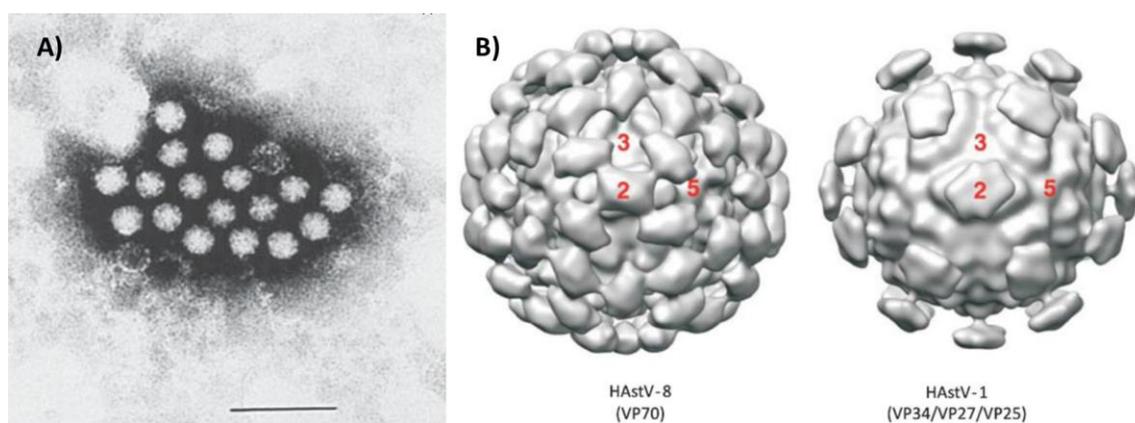
Las infecciones en humanos producidas por Astrovirus (*HAsV*, del inglés *Human Astroviruses*) han sido reportadas en todo las regiones del planeta, principalmente en bebés y niños pequeños (Madeley y Cosgrove, 1975; Guix et al. 2002; Victoria et al. 2007; De Grazia et al. 2013), incluso se han postulado como la segunda o tercera causa más común de GAI luego de la infección por RVA, y una causa importante de brotes esporádicos de GA (Méndez & Arias, 2013).

Recientemente, mediante estudios de metagenómica utilizando las nuevas metodología de secuenciación de nueva generación o *NGS* (de sus siglas en inglés: *Next*

*Generation Sequencing*), se han descubierto nuevos AstV altamente divergentes, capaces de infectar distintas especies de animales, incluyendo al humano, y posiblemente causando, en algunos casos, patologías distintas a la diarrea (Finkbeiner et al. 2008; Blomström et al. 2010; Quan et al. 2010; Holtz et al. 2011b; Li et al. 2013).

### 1.5.1 - Historia

Los AstV fueron descubiertos por Madeley y Cosgrove (1975) al observar por ME partículas virales pequeñas de unos 30 nm de diámetro, redondeadas, con forma de estrella con 5 ó 6 puntas (Figura 1.11A), en la materia fecal de niños hospitalizados por diarrea y de brotes de diarrea generados en guarderías. A su vez, Appleton y Higgins (1975) encontraron partículas similares en la materia fecal de niños con diarrea leve y vómitos. Debido a su forma, estas partículas fueron denominadas astrovirus (AstV) (Madeley & Cosgrove, 1975), aunque recién en 1982 se confirmaría que se trataba de un virus diferente a los previamente conocidos *Norwalk-like virus* (en la actualidad Norovirus), (Caul y Appleton, 1982).



**Figura 1.11. Estructura del virión de astrovirus.** A) Micrografía electrónica de un astrovirus humano aislado de una muestra fecal (la barra en la parte inferior representa 100nm). B) Reconstrucción tridimensional de astrovirus humanos obtenida mediante criomicroscopía electrónica. Partículas de HAstV-8 y HAstV-1 purificadas mediante gradientes de cloruro de cesio, sin tratar (izquierda) y tratada (derecha) con tripsina. Se indica la composición proteica para cada partícula. (Modificada de Méndez & Arias, 2013).

### 1.5.2 - Genoma y proteínas virales

Los AstV presentan un genoma de ARN simple hebra de polaridad positiva (ARNv(+)), cuyo tamaño varía entre 6,17 kb y 7,72 kb, excluyendo la cola poli-A en el extremo 3' (Finkbeiner et al. 2008; Fu et al. 2009). A grandes rasgos, el genoma viral está formado por regiones no codificante o UTR (del inglés: *Untranslated Region*) en

sus extremos 5' y 3', y tres marcos abiertos de lectura o ORFs (del inglés: *Open reading frames*) de longitud variable dependiendo del aislado (figura 1.12A). Los ORF1a y ORF1b se ubican en ese orden a continuación de la región 5' UTR y codifican proteínas no estructurales relacionadas con la transcripción y replicación del genoma viral. El ORF2 es el tercero a continuación de los anteriores y se encuentra en el extremo 3' precediendo la región 3' UTR. El ORF2 codifica para la poliproteína estructural, la cual se expresa desde un ARN subgenómico y es la región más variable del genoma (Méndez y Arias, 2013).

En algunos AstV se ha descrito un cuarto ORF, denominado ORFX, solapando el extremo 5' del ORF2 en el marco de lectura +1. Este ORF podría ser traducido a través de un mecanismo de *leaking scanning* aunque su producto proteico no ha sido confirmado experimentalmente (Firth y Atkins, 2010).

En el extremo 3' del genoma de algunos AstV, se forma una estructura secundaria altamente conservada denominada motivo *stem-loop II*. Si bien su función no ha sido determinada, se ha sugerido que podría interactuar con proteínas virales y celulares durante la función de replicación del genoma (Monceyron et al. 1997; Jonassen et al. 1998; Wang et al. 2001; Robertson et al. 2005).

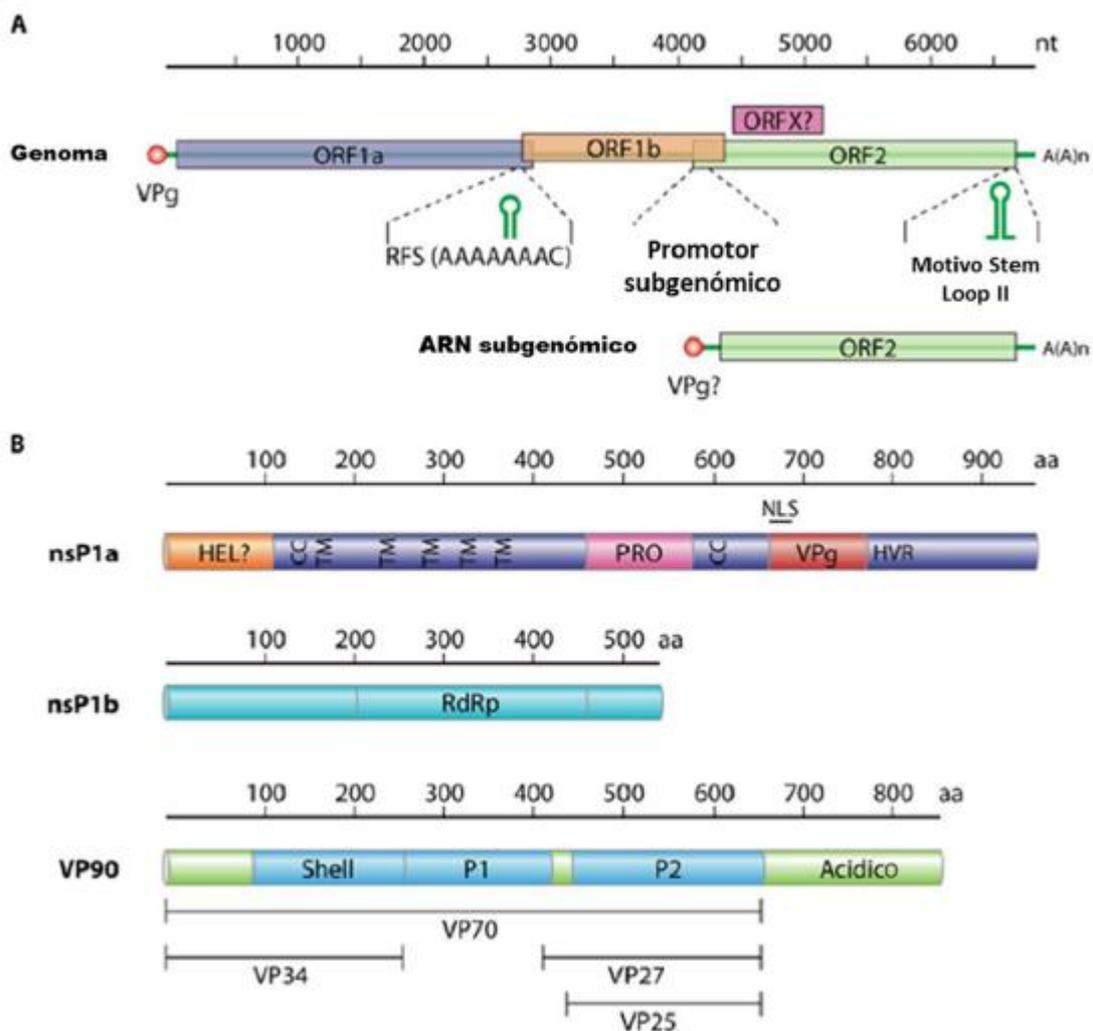
Otra estructura importante en el genoma de los AstV, la constituye la señal de cambio de marco para el ribosoma o RFS (del inglés: *Ribosoma Frameshift Signal*). Dicha señal se encuentra en la región de solapamiento del ORF1a con el ORF1b y es importante para la traducción de la ARN polimerasa dependiente de ARN o RdRp (del inglés: *RNA-dependent RNA-polymerase*).

Por otro lado, en la región de solapamiento del ORF1b y el ORF2 se encuentra una secuencia altamente conservada que podría ser parte del promotor para la síntesis del ARN subgenómico (Jonassen et al. 2003). Dicha secuencia, también ha sido identificada como un *hot spot* de recombinación genética, o sea, es un sitio donde ocurre con más frecuencia este mecanismo en el genoma de los AstV (Walter et al. 2001; Strain et al. 2008; Wolfaardt et al. 2011).

El ORF1a codifica un polipéptido denominado proteína no estructural 1a (nsP1a) y contiene un dominio putativo de helicasa o (HEL), varios dominios transmembrana (TM), dos dominios *coiled-coil* (CC), un dominio proteasa (PRO), un motivo VPg (proteína protectora del genoma) y un dominio hipervariable (HVR) (Figura 1.12B, parte de arriba). Por otro lado, el ORF1b codifica la RdRp.

El ORF1b codifica un péptido denominado proteína no estructural 1b (nsP1b), que da origen a la RdRp (Figura 1.12B, parte del medio) (Jiang et al. 1993; Marczinke et al. 1994).

El ORF2 codifica para un polipéptido precursor de la proteína de cápside (Figura 1.12B, parte de abajo), siendo el extremo N-terminal de la proteína, más conservado que el C-terminal y posiblemente el que interactúa con el ARN genómico viral (Jonassen et al. 2001; Wang et al. 2001; Geigenmuller et al. 2002). Por otro lado, el extremo C-terminal muestra una gran variabilidad genética, incluso a nivel de diferentes cepas que infectan una misma especie y está implicado en la formación de la espícula de la partícula viral (Krishna, 2005; Méndez y Arias, 2013).



**Figura 1.12 - Organización del genoma y productos proteicos de astrovirus humano. A)** Organización del genoma y del ARN subgenómico, con los marcos abiertos de lectura (ORFs) representados como bloques. Se muestra las regiones altamente conservadas donde se localizan la señal de cambio de marco del ribosoma (RFS), el promotor subgenómico y el motivo *stem loop II*. **B)** Motivos

característicos de los productos protéicos de HAstV. HEL: dominio putativo helicasa, TM: dominios transmembrana, CC: dominio *coiled-coil*, PRO: dominio proteasa, VPg: proteína de unión al genoma, HVR: región hipervariable, NLS: señal putativa de localización nuclear, RdRp: dominio de la ARN polimerasa dependiente de ARN. El ORF2 codifica la poliproteína estructural VP90, la cual consiste de las regiones conservadas *shell* y dominio P1, una región variable que contiene el dominio P2 (espículas de la cápside) y una región C-terminal ácida la cual es clivada por caspasas celulares resultando en VP70. Las partículas que contienen VP70 son clivadas adicionalmente por tripsina para originar las proteínas VP34, VP27 y VP25. Adaptada de Bosch y colaboradores (2014).

### 1.5.3 - Estructura del virion

AstV posee un virión desnudo, de simetría icosaédrica con 5 ó 6 proyecciones características en la superficie en forma de puntas, lo cual le otorga una forma de estrella (Figura 1.11A) en aproximadamente el 10% de los viriones (Bosch et al. 2014).

Los virus eliminados en la materia fecal, presentan un diámetro de 28 a 30 nm, mientras que los virus generados en cultivo celular presentan un diámetro de 41 nm y espículas en su superficie (Risco et al. 1995).

La poliproteína resultante de la traducción del ARN subgenómico (codificado por el ORF2), se denomina VP90 (de 90 kDa aproximadamente), y se ensambla para conformar inicialmente el virión, siendo luego procesada por caspasas celulares dando lugar a la proteína VP70 (figura 1.11B, parte de la derecha), de 70 kDa aproximadamente (Méndez et al. 2004).

Los viriones con VP70 como proteína de cápside son aun inmaduros, los cuales al egresar de la célula son clivados por la tripsina celular para generar los viriones maduros infecciosos con proteínas de cápside de 34, 27 y 25 kDa (VP34, VP27y VP25) (figura 1.11B, parte de la izquierda) (Méndez et al. 2002). Mientras que VP34 deriva de la región N-terminal altamente conservada de la poliproteína y constituye la superficie esférica de la cápside, VP27 y VP25 derivan del dominio C-terminal variable (figura 1.12B, parte de abajo) y forman las espículas diméricas (Krishna, 2005; Dong et al. 2011).

### 1.5.4 - Replicación viral

El ciclo de replicación de AstV puede ser resumido de la siguiente forma: i) una vez que el virus ha ingresado a la célula y se ha decapsidado, las poliproteínas no estructurales (nsP1a y nsP1a1b) son traducidas desde el genoma viral, II) el clivaje de las mismas genera proteínas no-estructurales relacionadas a la replicación del genoma,

lo cual permite generar el ARN genómico y subgenómico, iii) el ARN subgenómico es traducido para luego a la proteína de cápside, iv) una vez que se realiza la encapsidación y maduración del virión, el mismo es liberado de la célula (figura 1.13) (Bosch et al. 2014).

Se desconoce cuál es el receptor principal que HAstV utiliza para ingresar a la célula hospedera. Diferentes cepas de HAstV muestran diferente tropismo celular en cultivo, por lo que es probable que las interacciones iniciales con la célula hospedera sean diferentes (Brinker et al. 2000). Se ha sugerido que podría existir más de una molécula receptora o de unión, dentro de las cuales podríamos encontrar una molécula de naturaleza polisacárida (figura 1.13, parte A) (Dong et al. 2011). Incluso ha sido identificado un sitio putativo de unión al receptor en VP25, el cual podría reconocer una molécula de este tipo (Méndez y Arias, 2013).

Por otro lado, se ha confirmado que HAstV utiliza una vía de endocitosis mediada por clatrina como mecanismo de entrada a la célula (figura 1.13, parte B). Esta entrada también depende de la acidificación y maduración de los endosomas, donde la decapsidación podría ocurrir (figura 1.13, parte C) (Méndez et al. 2014).

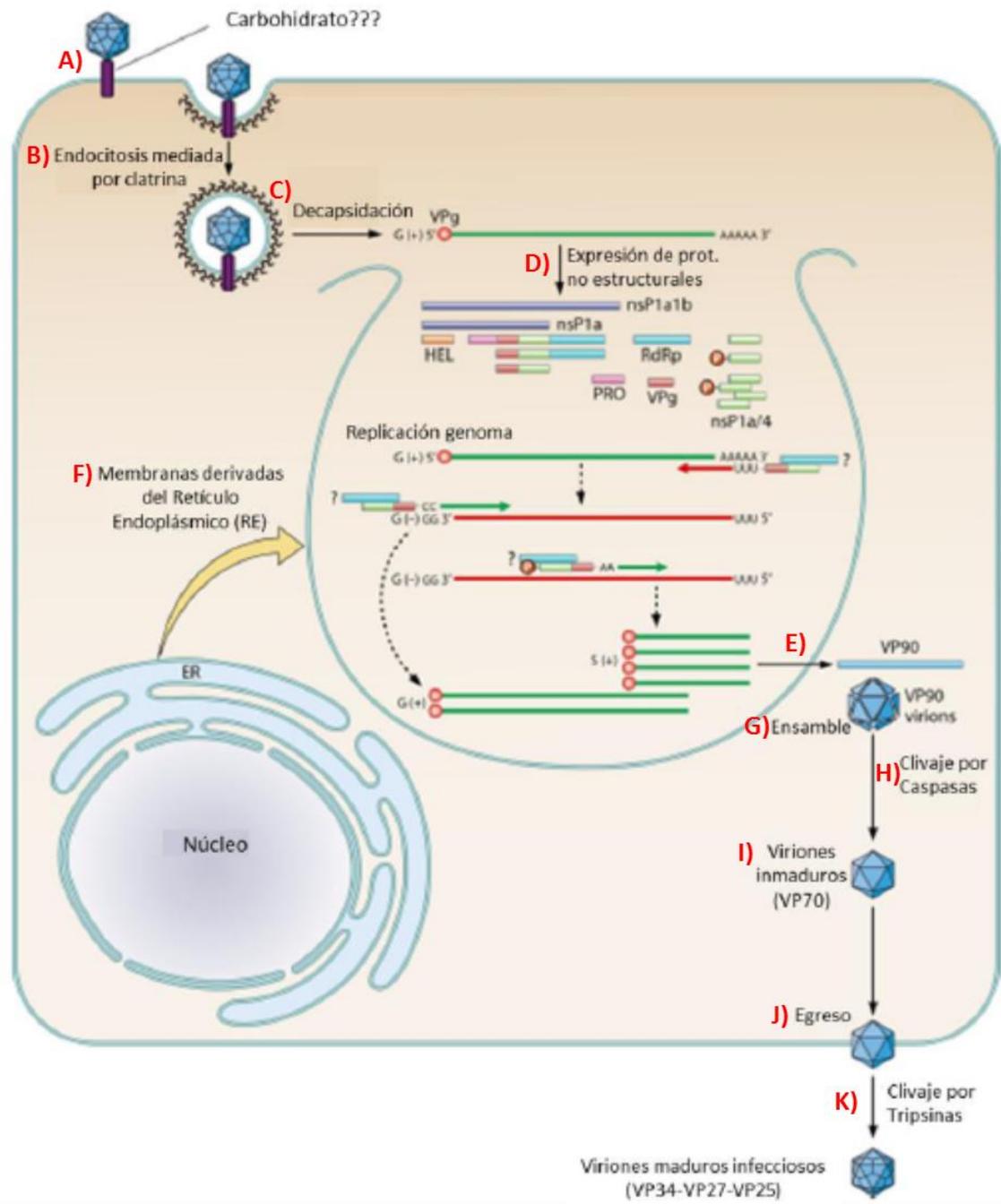
La proteína VPg ha demostrado tener un rol importante en la infectividad viral, una vez que el ARN ha sido decapsidado. Parecería que tiene un rol en el reclutamiento de factores celulares de inicio de la traducción, como ha sido descrito para los calicivirus (Fuentes et al. 2012; Thorne y Goodfellow, 2014). La traducción del genoma viral genera las poliproteínas nsP1a1b y nsP1a, las cuales son clivadas por la proteasa serina viral (que se encuentra en nsP1a) y algunas proteasas celulares, originándose de esta manera las proteínas no-estructurales individuales (figura 1.13, parte D) (Bosch et al. 2014).

El procesamiento proteolítico de la poliproteína nsP1a1b genera la proteína nsP1b (ARN polimerasa dependiente de ARN) y la proteína nsP1a, la cual es subsecuentemente clivada para generar varios productos (Bosch et al. 2014).

Las proteínas estructurales son expresadas desde el ARN subgenómico, primero como una poliproteína de 90 kDa denominada VP90. La síntesis de dicha proteína es llevada a cabo en los mismos compartimientos celulares donde se forman los complejos de replicación (figura 1.13, parte E) (Méndez et al. 2007).

Debido a que, tanto las proteínas no estructurales como el ARN viral han sido localizados conjuntamente en el retículo endoplásmico y que en nsP1a se ha predicho la existencia de una señal para la retención del retículo, se piensa que las membranas

intracelulares derivadas del retículo endoplásmico podrían ser el sitio celular para la replicación del genoma de HAstV (figura 1.13, parte F) (Guix et al. 2004).



**Figura 1.13 - Ciclo de replicación viral de astrovirus.** Las etapas del ciclo están indicadas con las letras rojas de A) a K). Por descripción de cada etapa referirse al texto. Adaptada de Bosch y colaboradores (2014).

Inicialmente, los complejos de VP90 ensamblan el virión inmaduro en asociación con membranas intracelulares mediante su extremo C-terminal (figura 1.13,

parte G). Luego, varias caspasas celulares clivan a VP90 (figura 1.13, parte H), disociando así los viriones de las membranas, y generando cápsides virales compuestas por la proteína VP70 (figura 1.13, parte I) (Méndez et al. 2007; Banos-Lara y Méndez, 2010). El procesamiento de VP90 hacia VP70 es requerido para que el virus pueda salir de la célula y parecería que la liberación de las partículas formadas por VP70 ocurre sin lisis celular (figura 1.13, parte J). Una vez en el exterior, los viriones maduran por acción de la tripsina, incrementando la infectividad de los mismos entre 3 a 5 órdenes de magnitud (figura 1.13, parte K) (Méndez et al. 2002, 2004). Sin embargo, se ha observado efecto citopático en algunas cepas de AstV de animales, por lo que se presume que existe más de un mecanismo dentro de la familia *Astroviridae* para egresar de la célula (Shimizu et al. 1990; Baxendale y Mebatsion, 2004; Méndez y Arias, 2013).

### 1.5.5 - Clasificación

Los AstV pertenecen a la familia *Astroviridae* que fue creada en 1995 en el sexto reporte del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV, 2015).

Esta familia está dividida en dos géneros en función del tipo de hospedero, *Mamastrovirus* y *Avastrovirus*, incluyendo partículas virales capaces de infectar mamíferos o aves, respectivamente (Méndez y Arias, 2013). Los HAstV eran clasificados únicamente en ocho genotipos (HAsV “clásicos”: HAstV-1 al -8), hasta el 2008 cuando fueron descubiertos los “HAstV emergentes”. Éstos últimos, son capaces de infectar a humanos, pero están más relacionados genéticamente con AstV de ratas (HAstV MLB), ovejas y visones (HAstV HMO/VA) que con los HAstV clásicos (Finkbeiner et al. 2008; Finkbeiner et al. 2009a, c; Kapoor et al. 2009; Chu et al., 2010; Méndez y Arias, 2013).

Actualmente, el género *Mamastrovirus*, incluye dos genogrupos, GI y GII, que suman un total de 19 especies virales entre los dos, denominadas *Mamastrovirus-1* a *Mamastrovirus-19*, para los cuales se utiliza la siguiente abreviación: MAstV-1 a MAstV-19, respectivamente. Ambos genogrupos incluyen virus de origen humano y animal. Los ocho genotipos clásicos de los HAstV (genotipos HAstV-1 a HAstV-8) se encuentran agrupados dentro de la especie viral *Mamastrovirus-1*. Este genogrupo también incluye a la especie viral *Mamastrovirus-6* (genotipo HAstV MLB-1). Por otro lado, los genotipos VA/HMO forman las especies virales *Mamastrovirus-8* y *-9*, ambas dentro del genogrupo 2. El género *Avastrovirus* se divide también en dos genogrupos, GI y GII, que suman en total 3 especies virales entre los 2, denominadas *Avastrovirus 1*

3, para los cuales se utiliza la siguiente abreviación: AAstV-1 a AAstV-3 (Tabla 1.1) (Bosch et al., 2010; ICTV, 2015).

Cabe resaltar, que la mayoría de lo que se conoce de la biología de los AstV está basado en estudios realizados con “HAstV clásicos” (MAstV-1), así como la enorme mayoría de los estudios de epidemiología que se han publicados también han sido en MAstV-1. Debido a que, como fue mencionado anteriormente, el descubrimiento de los “HAstV emergentes” (MAstV-6, -8 y -9) es muy reciente y relativamente pocos estudios se han realizado, siendo que a su vez, su rol en los casos de GA aún no ha sido totalmente establecido (Méndez & Arias, 2013).

Recientemente, Phan y colaboradores (2014) propusieron, la inclusión del vigésimo genotipo dentro del género *Mamastrovirus* debido a la detección de un nuevo y divergente AstV en un estudio de metagenómica de un caso inexplicado de diarrea humana.

Como fue mencionado anteriormente, los MAstV-1 agrupan a los AstV humanos clásicos que están divididos en 8 genotipos: HAstV-1 a HAstV-8. Dentro de estos genotipos, han sido descritos distintos linajes para algunos de ellos, en base a análisis filogenéticos y valores de identidad nucleotídica de secuencias parciales del ORF2 (principalmente), y específicamente en base a dos regiones definidas dentro del ORF2, denominadas regiones C y D (Bosch et al., 2014). Recientemente, nuevos linajes han sido descritos en base a la secuencia nucleotídica completa del ORF2 (Martella et al., 2014). A pesar de que esta nueva clasificación se basa en el ORF2 completo, los autores describen que es concordante con la clasificación en linajes previamente descrita basada en la región C del ORF2, con algunas pocas excepciones. Martella y colaboradores (2014), también proponen una nueva nomenclatura para identificar cada cepa de AstV de la siguiente manera: Abreviación de género y especie/nombre común de la especie de origen/país de origen (según código de tres letras de acuerdo al *ISO 3166-1 alpha-3*)/año en que fue indentificada/nombre común de la cepa dado por el investigador/opcional: Tipo (si es apropiado y está disponible)/opcional: linaje (si es apropiado y está disponible). A modo de ejemplo, la cepa prototipo de HAstV-1: *Oxford-1*, se describe según esta nomenclatura de la siguiente manera: MAstV-1/Hu/GBR/1993/Oxford-1/Type-1a.

**Tabla 1 - Clasificación de la familia *Astroviridae* según el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, 2015).**

GÉNERO	GENOGRUPO	ESPECIE	HOSPEDERO/S	INCLUYE
AVASTROVIRUS	1	<i>Avastrovirus 1</i>	Pavos	TAstV
		<i>Avastrovirus 2</i>	Pollos, Pavos	ANV, TAstV
	2	<i>Avastrovirus 3</i>	Pavos, Patos	DAstV, TAstV
MAMASTROVIRUS	1	<i>Mamastrovirus 1</i>	Humanos	HAstV-1 a 8
		<i>Mamastrovirus 2</i>	Felinos	FAstV
		<i>Mamastrovirus 3</i>	Porcinos	PAstV
		<i>Mamastrovirus 4</i>	León Marino	CslAstV
		<i>Mamastrovirus 5</i>	Caninos	CaAstV
		<i>Mamastrovirus 6</i>	Humanos	HAstV-MLB1
		<i>Mamastrovirus 7</i>	Delfín	BdAstV
	2	<i>Mamastrovirus 8</i>	Humanos	HAstV-VA2
		<i>Mamastrovirus 9</i>	Humanos	HAstV-VA1
		<i>Mamastrovirus 10</i>	Visón	MAstV
		<i>Mamastrovirus 11</i>	León Marino	CslAstV
		<i>Mamastrovirus 12</i>	Murciélagos	BatAstV
		<i>Mamastrovirus 13</i>	Ovinos	OAstV
		<i>Mamastrovirus 14</i>	Murciélagos	BatAstV
		<i>Mamastrovirus 15</i>	Murciélagos	BatAstV
		<i>Mamastrovirus 16</i>	Murciélagos	BatAstV
		<i>Mamastrovirus 17</i>	Murciélagos	BatAstV
		<i>Mamastrovirus 18</i>	Murciélagos	BatAstV
		<i>Mamastrovirus 19</i>	Murciélagos	BatAstV

ANV: Virus de la Nefritis Aviar, TAstV: Astrovirus de Pavo, DAstV: Astrovirus de Pato, OAstV: Astrovirus Ovino, CslAstV: Astrovirus de León Marino Californiano, MAstV: Astrovirus de Visón, HAstV: Astrovirus Humano, RAstV: Astrovirus de Rata, PAstV: Astrovirus Porcino, BdAstV: Astrovirus de Delfín, CaAstV: Astrovirus Canino, FAstV: Astrovirus Felino, CcAstV: Astrovirus de Ciervo. Adaptado de Méndez y Arias (2013).

### 1.5.6 - Mecanismos de variabilidad genética y evolución

La familia *Astroviridae* actualmente constituye una familia de virus emergentes y genéticamente diversos con una larga historia evolutiva y un amplio espectro de especies hospederas (van Hemert et al. 2007a).

La reconstrucción de los eventos evolutivos dentro de la familia *Astroviridae* indica que la separación entre los linajes aviares y de mamíferos ocurrió hace 310 millones de años y fue seguida por procesos de divergencia dentro de los virus de

mamíferos y de varias transmisiones entre especies (Lukashow y Goudsmith, 2002; van Hemert et al. 2007a, 2007b).

Mientras las infecciones interespecies han sido bien documentadas en aves de corral (Battisti et al. 2012; Bidin et al. 2012) y han sido sugeridas en mamíferos, especialmente en cerdos, gatos y humanos (van Hemert et al. 2007a; Ulloa y Gutiérrez, 2010; Lan et al. 2011; Xiao et al. 2013), aún se desconoce si los AstV de aves podrían ser capaces de infectar mamíferos y viceversa.

Interesantemente y considerando los HAstV clásicos y emergentes, las distintas relaciones evolutivas entre los genotipos indican que han ocurrido varias introducciones de AstV en los humanos (Jiang et al. 2013). Como consecuencia, el potencial zoonótico de estos virus es alto y futuras transmisiones de AstV no humanos hacia humanos probablemente ocurran.

La tasa de evolución para el genoma de HAstV fue determinada por Babkin y colaboradores en 2012 y se correspondió con lo esperado para virus de ARN,  $3,7 \times 10^{-3}$  (sustituciones de nucleótidos/sitio/año).

Cuando se comparan las tasas evolutivas entre diferentes AstV, aquellas más elevadas, especialmente en el ORF2, han sido descritas en AstV de cerdos, ovejas, visones y pavos en comparación con AstV de humanos, gatos y pollos (van Hemert et al. 2007b).

Por otra parte, la recombinación genética es otro de los mecanismos principales que han tenido un rol en la evolución de los HAstV y en la generación de cepas nuevas (Bosch et al. 2014). Se han encontrado recombinantes naturales tanto entre cepas del mismo genotipo como de distintos genotipos dentro de los HAstV clásicos (Walter et al. 2001; Pativada et al. 2011, 2013; Wolfaardt et al. 2011; De Grazia et al. 2012; Martella et al. 2013; 2014). Además, se han sugerido eventos de recombinación que involucran cepas de HAstV clásicos y de AstV de león marino (Rivera et al. 2010) o HAstV clásicos y AstV de cerdos (Ulloa y Gutiérrez, 2010). Estos resultados nos llevan al planteo de la hipótesis de un ancestro común o de un evento de transmisión zoonótica.

Los ocho genotipos de los HAstV clásicos dentro de la especie MAstV-1 comparten 63 a 84% de similitud a nivel de aminoácidos en la proteína de cápside, por otro lado para los Mamastrovirus 6, 8 y 9 (HAstV emergentes), la similitud varía entre 74 y 90%, 78 y 79% y 75 y 77%, respectivamente, sugiriendo que probablemente muestren diferentes propiedades antigénicas (Bosch et al. 2014). Como fue mencionado anteriormente, en los HAstV clásicos, se han identificado distintos linajes dentro de

algunos genotipos, así, se ha definido la existencia de seis linajes dentro de HAstV-1, cuatro linajes para HAstV-2, dos linajes para HAstV-3, tres linajes para HAstV-4, tres linajes para HAstV-5, dos linajes para HAstV-6 y tres linajes para HAstV-8 (Medina et al. 2000; Walter et al. 2001; Guix et al. 2002; Jackab et al. 2003; Colomba et al. 2006; Gabbay et al. 2007a, b; Liu et al. 2008; De Grazia et al. 2011; Medici et al. 2012; Martella et al. 2013; 2014).

### **1.5.7 - Patogénesis**

Los MAstV-1 son transmitidos mediante la ruta fecal-oral causando GA principalmente en niños, por lo general menores de 2 años, aunque las personas inmunocomprometidas, así como los ancianos, también constituyen un grupo de riesgo alto (De Benedictis et al. 2011). Los MAstV-1 afectan principalmente las células epiteliales del tracto intestinal. Infechan y replican dentro de los enterocitos maduros del tercio apical de las microvellosidades, sobre todo afectando el yeyuno, más que el duodeno (Sebire et al. 2004). El cuadro clínico se caracteriza por una diarrea acuosa leve de unos 2 a 3 días de duración que puede estar asociada a vómitos, fiebre, anorexia y dolor abdominal. El periodo de incubación promedio calculado para MAstV-1 es de 4,5 días, el cual se sitúa por encima del de RVA y Norovirus (Lee et al. 2013; Bosch et al. 2014). Generalmente, MAstV-1 causa un cuadro de GA más leve que RVA y NV y que se resuelve espontáneamente, aunque en algunos casos puede requerir hospitalización (Bosch et al. 2014). Aunque en niños altamente inmunocomprometidos, se ha demostrado que las infecciones por MAstV-1 pueden diseminarse sistemáticamente y causar infecciones graves e incluso letales (Wunderli et al. 2011).

La enfermedad en adultos puede ser transmitida mediante fómites, agua o alimentos contaminados (Abad et al. 2001; Belliot et al. 1997b), aunque también se ha evidenciado la transmisión de persona a persona (Midthun et al. 1993; De Benedictis et al. 2011). Se han reportado algunos casos de adultos sanos afectados por el virus (Belliot et al. 1997b; Pager y Steele, 2002), en los cuales además, al igual que para los niños, la infección puede darse de manera asintomática (Méndez-Toss et al. 2004).

### **1.5.8 - Tratamiento y Prevención**

Ante un cuadro de GA en niños infectados con MAstV-1, la terapia más común utilizada, es la universalmente aplicada a pacientes que sufren GA grave de cualquier

etiología, que consiste en el uso de soluciones de rehidratación oral o intravenosa (Bosch et al. 2014).

Las infecciones de MAstV-1 esencialmente pueden prevenirse mediante el control de las rutas de transmisión y controlando la enfermedad a nivel del paciente infectado. Es importante poder detectar el virus en el ambiente e inactivarlo, tanto en agua de consumo como en alimentos. También es importante la desinfección de fómites y superficies contaminadas, sobre todo en los centros de atención pediátrica en hospitales así como en guarderías (Bosch et al. 2014). Si bien la resistencia de los HAstV clásicos en agua potable es alta, los tratamientos de desinfección de 2 horas con 1 mg/L de cloro son efectivos (Abad et al. 1997).

Hasta el momento y a pesar que ha sido posible desarrollar partículas semejantes a virus o *VLPs* (del inglés, *virus-like particles*) de HAstV en distintos sistemas (Dalton et al. 2003; Caballero et al. 2004), no se han desarrollado aún vacunas para el virus. Probablemente ello se deba al bajo impacto de la infección por MAstV-1 en pacientes inmunocompetentes y a la necesidad de vacunas multivalentes para proteger al menos contra los genotipos más prevalentes, debido a la ausencia de protección heteróloga (Koopmans et al. 1998).

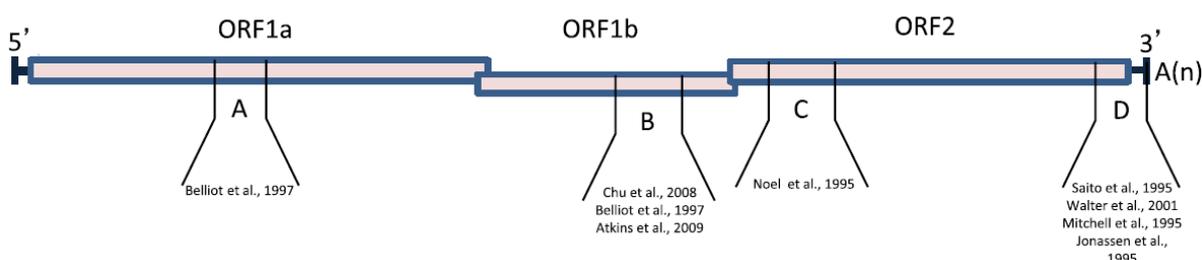
### **1.5.9 - Diagnóstico**

Al igual que los casos de RVA y NV, las metodologías de ME con la técnica de contrastación negativa, por la que fueron descubiertos estos virus pueden ser utilizadas como herramientas de diagnóstico (Appleton y Higgins, 1975; Madeley y Cosgrove, 1975; Cubitt et al. 1999). Sin embargo, como ya ha sido mencionado, estas técnicas presentan algunas limitaciones: i) tiene sensibilidad baja, ii) técnica laboriosa, iii) requiere un usuario entrenado, y iv) un equipo muy costoso. Sumado a esto, en el caso de AstV, solamente un 10% de las partículas muestran la característica estructura en forma de estrella, y la sensibilidad de la microscopía electrónica requiere una concentración viral de  $10^7$  partículas por gramo de materia (Glass et al. 1996).

Actualmente, existen al menos dos kits comerciales validados basados en EIE para la detección de HAstV clásicos a partir de materia fecal. Si bien la tipificación no es posible, y en general presentan una sensibilidad más baja que las técnicas moleculares, son útiles para la rápida detección de los virus cuando se deben analizar grandes cantidades de muestras, o para la utilización en clínicas y hospitales por el

personal médico ya que no requieren de un Laboratorio de referencia ni de un usuario entrenado (Medina et al. 2000; Putzker et al. 2000; Rovida et al. 2013).

Las técnica molecular de RT-PCR es una técnica muy sensible que ofrece umbrales de detección tan bajos como 10 a 100 copias genómicas por gramo de materia fecal, por lo cual los métodos convencionales de RT-PCR son ampliamente utilizados actualmente en muchos Laboratorios privados y públicos de diagnóstico, así como por los grupos de investigación en la Universidades tanto para realizar *screening* como para caracterizar luego el aislado a través del análisis de la secuencia nucleotídica del producto amplificado mediante estudios filogenéticos (Glass et al. 1996). Actualmente muchas metodologías de RT-PCR han sido desarrolladas, direccionadas a diferentes regiones del genoma de MAstV-1, denominadas región A a D (Figura 1.14) (Martella et al., 2014).



**Figura 1.14 - Esquema representativo del genoma de astrovirus con la posición de las diferentes regiones (A-D) que son comúnmente utilizadas para la detección y caracterización molecular de los MAstV-1.** Se muestran las referencias a los trabajos que describen protocolos que han sido desarrollados direccionados a cada una de las regiones. Tomado de Martella y colaboradores (2014).

Dentro de las técnicas moleculares, la RT-PCR en tiempo real o qRT-PCR (del inglés, *quantitative RT-PCR*), principalmente mediante la tecnología *TaqMan*<sup>®</sup>, ofrece las ventajas de ser más rápida que la RT-PCR convencional y que permite la cuantificación de las copias genómicas presentes la muestra (Le Cann et al. 2004; Royuela et al. 2006; Dai et al. 2010). Como desventaja, esta técnica no permite la caracterización molecular de la cepa mediante análisis filogenético de la secuencia nucleotídica, ya que generalmente los fragmentos amplificados son chicos (aprox. 100pb) y no aportan suficiente información, además de que el equipo utilizado aún es costoso, sobre todo para laboratorios de países en vías de desarrollo.

La técnica de RT-PCR o qRT-PR precedida del previo pasaje en cultivo celular en la línea CaCo-2 combinado con el pre-tratamiento del inóculo viral con tripsina

constituye, constituye la técnica *gold standard* para el aislamiento de HAstV clásicos a partir de muestras clínicas (Willcocks et al. 1994; Brinker et al. 2000). En el caso de muestras ambientales, varios métodos de cultivo celular integrados a RT-PCR han sido descritos, los cuales permiten evidenciar la infectividad del virus en dicha muestra (Grimm et al. 2004).

#### **1.5.10 - Epidemiología de MAstV-1**

Los MAstV-1 generalmente afectan a niños menores de cinco años, siendo en niños entre cero y dos años, el rango de edades en la cual la infección es más frecuente (Bosch et al. 2014). Presentan una distribución mundial, siendo su incidencia media 11%, con 7% y 23% en áreas urbanas y rurales, respectivamente (Bosch et al. 2013). La incidencia es usualmente mayor en países en vías desarrollo (Basu et al. 2003; Kiulia et al. 2007; Reither et al. 2007). Han sido reportados como responsables de hasta un 20% de los casos de diarrea esporádica no bacteriana, con una incidencia entre 0,5 y 15% en los brotes de diarrea (Kirkwood et al. 2005; Moser y Schultz-Cherry, 2005).

En base a estudios de epidemiología con MAstV-1, se ha observado una tasa de detección de hasta 27% en infecciones esporádicas en la comunidad y de 1,6% a 16% en niños hospitalizados por GA (Gaggero et al., 1998; Ratcliff et al., 2002; Jakab et al., 2004). En países desarrollados, su prevalencia varía de 2 a 11%, en tanto que en países en vías de desarrollo de 2 a 26% (Chikhi-Brachet et al., 2002; Cunliffe et al., 2002; Dalton et al., 2002; Ratcliff et al., 2002).

Los MAstV-1 se transmiten por ruta fecal-oral, y este ha sido asociado a importantes brotes debido al consumo de alimentos contaminados (Oishi et al. 1994; Iritani et al. 2014), y también ha sido detectado en el agua residual y superficial (Pintó et al. 1996; 2001; Nadan et al. 2003; Le Cann et al. 2004; Morsy El-Senousy et al. 2007). En dichas matrices acuáticas el virus ha demostrado gran estabilidad facilitando de esta manera su transmisión hídrica (Abad et al. 1997; Bosch et al. 1997).

Existen alimentos, con una alta susceptibilidad a ser contaminados con MAstV-1, en etapas previas a la cosecha, como es el caso de moluscos bivalvos cultivados en aguas contaminadas y productos frescos regados con agua contaminada, tales como lechugas, cebollas de verdeo y otros vegetales, así como frutas del tipo frambuesas y frutillas (Le Guyader et al. 2000; Pintó y Bosch, 2008). Dichos productos, por lo general llevan poco, o ningún procesamiento antes de su consumo y así actúan como vehículo en la transmisión de MAstV-1 entre otros virus entéricos (Kurtz y Lee, 1987).

También el uso de agua contaminada, con fines recreacionales, puede originar un brote de gastroenteritis por MAstV-1 como lo señala el caso de un brote que afectó a niños y adultos usuarios de una piscina cuya agua contenía MAstV-1 (Maunula et al. 2004).

Las prácticas higiénicas inadecuadas por parte del personal gastronómico, son a menudo las responsables de la contaminación de productos tales como ensaladas y sándwiches, los cuales se consumen sin cocción o apenas cocidos. Dicho personal, muchas veces, presenta infecciones asintomáticas por MAstV-1 y están implicados en brotes de gastroenteritis (Todd et al. 2007).

Los fómites y superficies tienen un rol importante en la diseminación de MAstV-1 a nivel de instituciones como hospitales, residenciales de adultos mayores, restaurantes, y guarderías ya que pueden contener altas concentraciones del virus (Cubitt, 1999; Abad et al. 2001; Gallimore et al. 2005).

Al igual que para RVA, las infecciones por MAstV-1 en regiones de clima templado ocurren mayoritariamente en los meses más fríos de año, descendiendo dramáticamente en los meses de calor. Por otro lado, en regiones con clima tropical, la mayor incidencia de infecciones tiende a ocurrir en los meses lluviosos (Cruz et al. 1992; Maldonado et al. 1998, Bosch et al. 2014). Posiblemente la alta incidencia en los meses de invierno se deba a la mejor estabilidad del virus en bajas temperaturas (Abad et al. 1997, 2001).

#### **1.5.10.1 - Epidemiología Molecular MAstV-1 en el mundo**

De los 8 genotipos de MAstV-1, el genotipo HAstV-1 es el predominante a nivel mundial, aunque existen algunas excepciones donde la predominancia es del HAstV-2 o del par HAstV-1/HAstV-8 (Guerrero et al. 1998; Méndez-Toss et al. 2004; Méndez y Arias, 2013). Generalmente, con menor frecuencia que el HAstV-1 son detectados los genotipos HAstV-2, 3, 4, 5 y ocasionalmente el HAstV-8, dependiendo de la región; mientras que los genotipos HAstV-6 y HAstV-7 son raramente detectados (Palombo y Bishop, 1996; Mustafa et al. 2000; Guix et al. 2002; Méndez-Toss et al. 2004; Gabbay et al. 2007a; Liu et al. 2008; De Grazia et al. 2011).

Se ha observado una alta prevalencia de MAstV-1 recombinantes en niños con GA en India y África (Verma et al. 2010; Wolfaardt et al. 2011). Un estudio realizado en España mostró que la mayoría de las infecciones por HAstV-1 y HAstV-3 ocurrían en niños menores de 2 años, mientras que las infecciones por HAstV-4 ocurrían en

niños mayores de 4 años. A partir de estos hallazgos se especuló con que la inexistencia de inmunidad heterotípica pudiera incidir de manera importante en la prevalencia de los HAstV clásicos (Guix et al. 2002).

#### **1.5.10.2 - Epidemiología molecular de MAstV-1 en América Latina**

En América Latina, Brasil ha sido el país que ha realizado más estudios sobre epidemiología molecular de MAstV-1. Sin embargo, otros países de la región también han realizado estudios sobre la incidencia de MAstV-1 en los casos de GA en niños. A continuación se comenta brevemente algunos de estos estudios.

En Argentina, en la ciudad de Mendoza, en el período de 1995 a 1999, los MAstV-1 fueron detectados en 3,5% y 3,9% de los niños menores de 3 años no hospitalizados y hospitalizados por GA, respectivamente. El HAstV-1 fue el más prevalente con 41% de los casos genotipados, seguido de HAstV-4 (25%), HAstV-2 y HAstV-3 (13%) y HAstV-5 (8%) (Espul et al., 2004). En la ciudad de Buenos Aires, los MAstV-1 fueron detectados en 7% de los casos de GA de niños menores a 3 años en el período de 1997 a 1998 (Bereciartu et al., 2002). Otro estudio retrospectivo de 1997 a 1998 realizado en la ciudad de Córdoba, a partir de muestras de niños menores de 3 años hospitalizados por GA, mostró una prevalencia de 4,5% (Giordano et al., 2001). En el período 2001-2002 se realizó en la misma ciudad un estudio en pacientes de ambulatorios menores de 3 años donde la prevalencia de MAstV-1 fue de 12,4% (Giordano et al., 2004).

En Chile, la detección de MAstV-1 en niños con diarrea que necesitaron atención médica, varió de 7% a 16%. El genotipo HAstV-1 fue el más frecuentemente detectado seguido por el HAstV-2 y HAstV-4 (Gaggero et al., 1998).

En México, fue realizado un estudio prospectivo en una comunidad periurbana de la ciudad de México durante tres años (1988 a 1991), donde fue detectado en 6,3% de las muestras analizadas, en donde se observó una gran diversidad de genotipos detectados: HAstV-2 (42%), HAstV-4 (23%), HAstV-3 (13%), HAstV-1 (10%), HAstV-5 (6%), y HAstV-7 (6%) (Walter et al., 2001). En un segundo estudio más reciente realizado en cinco localidades de México, en el período de octubre de 1994 a Marzo de 1995, los MAstV-1 fueron investigados en pacientes sintomáticos y asintomáticos, detectándose una prevalencia de 4,6% y 2,6%, respectivamente. Fueron detectados 7 de los 8 genotipos de MAstV-1, siendo los HAstV-1 y -3 los más prevalentes entre los pacientes con GA. HAstV-8 fue detectado en 3 localidades

geográficas, siendo en una de ella tan prevalente como el HAstV-1 (40%) (Méndez-Toss et al. 2004)

En estudio realizado por Medina y colaboradores (2000), los MAstV-1 fueron investigados en niños con GA de Colombia y Venezuela, donde este virus fue detectado en 5% y 10% de los casos, respectivamente. El HAstV-1 fue el genotipo más prevalente en ambos países.

En Brasil, se ha observado la presencia de MAstV-1 en todas las regiones del país. En Río de Janeiro, en el período de 1994 a 2008, considerando muestras de materia fecal de brotes de diarrea así como de casos esporádicos en un hospital de niños, MAstV-1 tuvo una tasa de detección de 3,5%, caracterizándose los genotipos HAstV-1, HAstV-2, HAstV-4 y HAstV-5 (Ferreira et al., 2012). En la misma ciudad, un estudio realizado durante el año de 2004 en niños hospitalizados por GA en tres hospitales mostró una tasa de detección del 14%, en donde el 85% de los casos correspondió a niños menores de 2 años, y fueron detectados los genotipos HAstV-1 (71%), HAstV-2 (17%), HAstV-8 (9%) y HAstV-4 (3%) (Victoria et al., 2007). En la ciudad de San Pablo, en un estudio en niños menores de 6 años de edad con GA de diferentes hospitales, en el período de 1994 a 1999, MAstV-1 tuvo una tasa de detección de 20,6%. Este estudio también analizó muestras de materia fecal de niños sin cuadro de diarrea encontrando una tasa de 17,8% (Resque et al., 2007). En el período de 2000 a 2004, MAstV-1 tuvo una tasa de detección del 3,1% en niños menores de 3 años hospitalizados con GA en la ciudad de Campo Grande-Mato Grosso del Sur (Andreas et al., 2008). Al norte de Brasil, en Belén, un estudio retrospectivo con muestras de diarreas de niños en el período de 1990 a 1992 mostró que MAstV-1 tuvo una tasa de detección del 5,4% con predominancia alternada de los genotipos HAstV-1, HAstV-2, y HAstV4 (Gabbay et al., 2007). Más recientemente, un estudio realizado por Xavier y colaboradores (2015), fue investigada la presencia de MAstV-1 y de AstV emergentes en muestras clínicas de niños con GA de tres regiones costeras del país (Noreste, Sur y Sureste) durante el período de 2005 a 2011. Una prevalencia de general de 7,1% de MAstV-1 fue observada, siendo en HAstV-1 el genotipo más frecuentemente detectado durante todo el período. HAstV-1 fue el genotipo más prevalente en las regiones Sur y Sureste, pero no en la región Norte (donde HAstV-3 fue el más prevalente). Fue detectada una gran diversidad de genotipos de MAstV-1 (HAstV-1, -2, -3, -4, -6 y -8), e, interesantemente, el MAstV-6 (MLB-1) fue detectado por primera vez en el país, aunque solo en 1% de las muestras.

### **1.5.11 - MAstV-1 en aguas residuales**

Estudio de HAstV en distintas matrices acuáticas han sido ampliamente documentados desde hace varios años. Sin embargo, pocos de estudios han caracterizado molecularmente las distintas cepas que circulan en el ambiente (Nadan et al. 2003; Meleg et al. 2006; Rodríguez-Díaz et al. 2009; Aw y Gin, 2010, 2011; Fumian et al. 2013; Zhou et al. 2014).

En algunos estudios realizados en Sudafrica (Nadan et al., 2003), Hungría (Meleg et al., 2006), Singapur (Aw & Gin, 2010) y China (Zhou et al. 2014), fue realizada la caracterización molecular de MAstV-1, reportando la presencia de distintos genomas en aguas residuales con y sin tratamiento, así como en aguas superficiales utilizadas como cuerpos receptores de las anteriores.

En la región de América Latina y el Caribe han sido realizados pocos estudios que determinan la diseminación de los HAstV en el ambiente, en particular en matrices acuáticas. La información disponible proviene principalmente de dos trabajos realizados en Brasil (Miagosotovich et al., 2008; Fumian et al., 2013) y uno en Venezuela (Rodríguez-Díaz et al., 2009), donde también fueron investigados los diferentes genomas de MAstV-1 en aguas residuales con y sin tratamiento, así como en aguas superficiales que son utilizadas como cuerpos receptores.

### **1.5.12 - HAstV en aguas residuales de Uruguay**

Hasta el momento, no se conoce en nuestro país el rol que juegan los Astrovirus humanos en la generación de casos de GAI. Sin embargo, la presencia de AstV a partir de aguas residuales ya ha sido abordada por nuestro grupo de investigación en el marco de una tesis de maestría finalizada este año (Lizasoain, 2015). A partir de la cual, hemos podido detectar y caracterizar molecularmente MAstV-1 a partir de aguas residuales de cuatro ciudades localizadas en las regiones del litoral Norte (Lizasoain et al., 2015a - Anexo 1), y Este (Lizasoain et al., 2015b - Anexo 2) de nuestro país. A su vez, en las muestras colectadas en la región Este, pudimos detectar la presencia del HAstV emergente MLB-1 (MAstV-6), lo que represento el primer reporte de este genotipo a partir de muestras ambientales en América Latina (Lizasoain et al., 2015b - Anexo 2). Por último, a partir de este mismo conjunto de muestras de agua residual urbana colectadas en la región litoral Este de nuestro país, pudimos detectar y caracterizar molecularmente AstV y NV caninos (Lizasoain et al., 2015c - Anexo 3).

## **2 – IMPORTANCIA DE LA PROBLEMÁTICA ABORDADA. RELEVANCIA.**

Los RVA constituyen los agentes etiológicos más importantes de GA Infantil (GAI) en niños menores de 5 años de edad en todo el mundo. Debido a esto, 79 países en todo el mundo han incorporado la vacuna anti-RVA en sus PNGI. Uruguay, junto a Chile, Surinam y Guayana Francesa, son los únicos países de América del Sur que aún no han incorporado esta vacuna en sus PNGI. Esta vacuna ha mostrado ser muy eficaz en reducir las hospitalizaciones y muertes por GAI. Los NV humanos son los agentes etiológico más importante de brotes de GA en humanos a nivel mundial, y, a diferencia de RVA, afecta a personas de todos los grupos etarios. Debido a esto, actualmente vacunas contra el NV están en fase 1 de desarrollo en diferentes regiones del mundo. En el caso de las GAI, los NV han sido definidos como los segundos en importancia epidemiológica luego de los RVA. Al igual que los RVA y NV, los MAstV-1 han sido reportados en todas las regiones del planeta, y han sido establecidos como el segundo o tercer agente etiológico más importante de GAI, luego de los RVA y los NV, respectivamente, dependiendo de la región geográfica.

En América latina existen importantes antecedentes de detección y caracterización molecular de las cepas de RVA, NV y MAstV-1 en casos de GAI en la mayoría de los países de la región. En éste contexto, es de destacar la enorme cantidad de estudios que se han realizado en Brasil y Argentina, siendo ambos los principales países que han contribuido al conocimiento de la epidemiología molecular de estos virus en la región desde mediados de 1990, sobre todo en RVA. Los resultados de estos estudios han permitido establecer un detallado conocimiento del impacto en la salud infantil a nivel nacional que ha generado RVA, y a establecer la epidemiología molecular de las cepas que circulan en todo el territorio y en cada una de sus regiones. Estos logros han hecho posible que hoy en día se haya implementado la vacuna para este virus en ambos países.

En el caso de Uruguay, no hay reportes sobre estudios de NV y MAstV-1 en casos de GAI. Solamente el RVA ha sido estudiado y todos los estudios han sido llevados a cabo a partir de muestras obtenidas en la ciudad de Montevideo, con solo un reporte de este virus realizado en el interior y hace muchos años. La mayoría de estos estudios fueron publicados en revistas científicas nacionales, y solo cuatro de ellos fueron publicados en revistas internacionales indexadas. De estos cuatro estudios, solo uno de ellos realizó la caracterización molecular de los genotipos de RVA de acuerdo a

los estándares que recomienda la OMS, pero en ese estudio solo el genotipo G fue determinado, y en muestras de hace 15 años atrás.

En el caso de la virología ambiental en Uruguay, solamente los MAsV-1 han sido recientemente abordados por nuestro grupo en el marco de una tesis de maestría (Anexos 1, 2 y 3). Es de destacar que antes de la realización del presente trabajo de tesis doctoral, no existían estudios publicados de virología ambiental en el país. El estudio de los virus entéricos a partir del agua residual urbana permite obtener un panorama completo de la diversidad, epidemiología, estacionalidad y grado de contaminación con los mismos. También permite conocer los virus que circulan en la población, ya sea en casos sintomáticos y asintomáticos, así como individuos de todos los grupos etarios. Estos abordajes complementan los estudios de epidemiología realizados a partir de muestras clínicas, o, directamente permiten dar a conocer la epidemiología a partir de muestras ambientales en aquellos lugares donde no se pudo acceder a muestras clínicas.

Debido a lo mencionado, en este trabajo de tesis fueron estudiados estos tres virus a partir de muestras clínicas y ambientales colectadas en distintas regiones del interior del país. En primera instancia, en el marco de esta tesis se pudieron poner a punto técnicas moleculares que nos permitieron la detección, cuantificación y caracterización de estos virus en ambos tipos de muestras. En el caso de las muestras clínicas fue llevado a cabo un estudio de epidemiología molecular de carácter prospectivo y descriptivo, durante dos años en la ciudad de Salto. En dicho estudio se determinaron por primera vez a nivel nacional los genotipos G y P de RVA. Por otro lado, en el caso de las muestras ambientales, se estudiaron aguas residuales sin tratamiento de 6 ciudades distribuidas en las regiones litorales Noroeste y Este del país. Fueron detectados y caracterizados a nivel molecular, en ambos estudios, una gran diversidad de cepas virales, las cuales pudieron ser comparadas a nivel filogenético entre sí (muestras clínicas vs. muestras ambientales), así como también con cepas contemporáneas de la región y el mundo.

Este trabajo de tesis doctoral, representa la primera experiencia en este tipo de estudios por parte de nuestro recientemente formado grupo de investigación, el único en el área de la virología localizado en el interior del país desde mediados del año 2010. Estos estudios permitirán en el futuro próximo, contribuir a la creación de una red nacional de vigilancia epidemiológica de virus entéricos tanto en el ambiente como en casos clínicos, en conjunto con laboratorios de virología de Montevideo y de otros países de la región y el mundo.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivo general**

Contribuir al conocimiento mediante el estudio detallado de la diversidad genética y epidemiología molecular de virus gastroentéricos de gran impacto para la salud humana, a partir muestras clínicas y ambientales colectadas en zonas limítrofes y turísticas del litoral noroeste y este del país.

#### **3.2 – Objetivos específicos**

**3.2.1** – Establecer, evaluar y aplicar metodologías de detección y cuantificación moleculares para RVA, NV (GI y GII) y MAstV-1, con el fin de investigar la presencia y distribución de estos virus en muestras ambientales.

**3.2.2** – Investigar la presencia de cepas recombinantes en NV detectadas durante un año de muestreo en casos clínicos de gastroenteritis aguda en niños hospitalizados de la ciudad de Salto.

**3.2.3** – Determinar la epidemiología molecular de RVA mediante estudios filogenéticos, en muestras clínicas colectadas durante dos años completos (2011-2012), de niños hospitalizados con gastroenteritis aguda en la ciudad de Salto.

**3.2.4** – Caracterizar molecularmente RVA mediante estudios filogenéticos a partir de aguas residuales urbanas de diferentes ciudades, y realizar estudios comparativos entre las cepas ambientales y aquellas caracterizadas en los casos clínicos de Salto. Analizar también la distribución geográfica y temporal de los RVA.

**3.2.5** – Realizar estudios filogenéticos a fin de determinar la diversidad genética de NV a partir de aguas residuales urbanas de diferentes ciudades, analizando también su distribución geográfica y temporal.

**3.2.6** – Realizar estudios de reconstrucción demográfica y filogeográfica de cepas de NV previamente caracterizadas procedentes de muestras ambientales, mediante análisis de coalescencia.

**3.2.7** – Realizar estudios filogenéticos detallados a fin de establecer la epidemiología molecular de MAstV-1 y NV a partir muestras clínicas colectadas durante dos años completos (2011-2012), en niños hospitalizados con gastroenteritis aguda en la ciudad de Salto. Comparar las relaciones filogenéticas existentes entre éstas cepas y aquellas caracterizadas en muestras ambientales. Investigar la presencia de cepas recombinantes de MAstV-1.

#### **4 – MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS**

Los materiales, métodos y resultados de este trabajo de tesis son presentados en forma de artículos científicos publicados y enviados para publicación.

Éstos son presentados, relacionándolos a los objetivos específicos, y de acuerdo al orden cronológico en el que fueron analizados los datos obtenidos en esta tesis.

Para aquellos resultados que aún no han sido enviados para publicación, que se describen al final de esta sección, se hace una descripción de los materiales, métodos y resultados.

**4.1 – Detección y cuantificación por técnicas de biología molecular de virus gastroentéricos en aguas residuales descargadas al Rio Uruguay (Artículo 1).**  
(Vinculado a objetivo específico 3.2.1)

Food Environ Virol (2014) 6:116–124  
DOI 10.1007/s12560-014-9143-7

ORIGINAL PAPER

**Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay**

M. Victoria · L. F. L. Tort · M. García ·  
A. Lizasoain · L. Maya · J. P. G. Leite ·  
M. P. Miagostovich · J. Cristina · R. Colina

**Objetivos:**

- Realizar la detección por RT-PCR cualitativas de RVA, NV (GI y GII) y MAstV-1.
- Cuantificar por RT-PCR en tiempo real las muestras positivas.
- Determinar la frecuencia y concentración de los tres virus en el agua residual de cada ciudad analizada.
- Determinar la distribución de los tres virus de acuerdo al mes de colecta a lo largo de todo el año de estudio.

**Revista:** *Food and Environmental Virology* (2014), 6: 116-124.

## Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay

M. Victoria · L. F. L. Tort · M. García ·  
A. Lizasoain · L. Maya · J. P. G. Leite ·  
M. P. Miagostovich · J. Cristina · R. Colina

Received: 31 October 2013 / Accepted: 24 March 2014 / Published online: 29 April 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** The aim of this study was to assess the viral contamination of group A rotavirus (RVA), norovirus (NoV), and human astrovirus (HAstV) in sewage directly discharged into Uruguay River and to characterize RVA genotypes circulating in Uruguay. For this purpose, sewage samples ( $n = 96$ ) were collected biweekly from March 2011 to February 2012 in four Uruguayan cities: Bella Unión, Salto, Paysandú, and Fray Bentos. Each sample was concentrated by ultracentrifugation method. Qualitative and quantitative RT-PCR for RVA, NoV, and HAstV were performed. A wide dissemination of gastroenteric viruses was observed in the sewage samples analyzed with 80 % of positivity, being NoV (51 %) the most frequently detected followed by RVA with a frequency of 49 % and HAstV with 45 %. Genotypes of RVA were typed using multiplex semi-nested RT-PCR as follows: P[8] ( $n = 15$ ), P[4] ( $n = 8$ ), P[10] ( $n = 1$ ), P[11] ( $n = 1$ ), G2 ( $n = 29$ ), and G3 ( $n = 2$ ). The viral load ranged from  $10^3$  to  $10^7$  genomic copies/liter, and they were detected roughly with the same frequency in all participant cities. A peak of RVA and

HAstV detection was observed in colder months (June to September), whereas no seasonality was observed for NoV. This study demonstrates for the first time, the high degree of gastroenteric viral contamination in the country; highlighting the importance of developing these analyses as a tool to determine the viral contamination in this hydrographic boundary region used by the local populations for recreation and consumption, establishing an elevated risk of gastroenteric diseases for human health.

**Keywords** Sewage samples · Group A rotavirus · Norovirus · Human astrovirus · RT-PCR

### Introduction

Diarrhea remains the second leading cause of death among children under 5-years old globally, causing about 1.3 million preventable deaths each year, mainly in developing countries (WHO 2009a; Wazny et al. 2013). Considering this alarming data, 88 % of them are attributable to unsafe water, inadequate sanitation, and poor hygiene. Improvements in access to safe water and adequate sanitation can help in preventing this elevated number of deaths caused by diarrhea (Black et al. 2003).

Group A rotavirus (RVA) and norovirus (NoV) are the most important gastroenteric viruses that cause diarrhea and others symptoms of acute gastroenteritis like vomit and abdominal pain (Churgay and Aftab 2012; Payne et al. 2013). They are excreted in feces from infected persons during the period of acute diarrhea at high concentrations that can reach up to  $10^{11}$  viral particles per gram of feces in the case of RVA and NoV (Desselberger 1999; Chan et al. 2006). Gastroenteric viruses can be excreted after the period of acute diarrhea and also in asymptomatic patients

M. Victoria · L. F. L. Tort · M. García · A. Lizasoain ·  
L. Maya · R. Colina (✉)  
Laboratorio de Virología Molecular – Regional Norte,  
Universidad de la República, Gral. Rivera 1350, 50000 Salto,  
Uruguay  
e-mail: rodneycolina1@gmail.com

J. P. G. Leite · M. P. Miagostovich  
Laboratorio de Virologia Comparada y Ambiental, Instituto  
Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brazil 4365, Manguinhos,  
Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

J. Cristina  
Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones  
Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República,  
Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

(Gallimore et al. 2004; O’Ryan et al. 2009; Barreira et al. 2010).

The dissemination of these pathogens in the environment is due to the discharge of wastewater (treated or not) collected from the cities into surface waters like rivers or lagoons. These viruses are resistant to adverse conditions of the environment and persist for long periods in environmental waters without losing its infectivity capacity, originating a risk of infecting people that enter in contact with these waters mainly due to their low infectious dose (approximately 10 viral particles for NoV) (Teunis et al. 2008; Seitz et al. 2011). It has been demonstrated that rotavirus and human astrovirus (HAstV) can persist infective for several days in surface water and months in groundwater (Espinosa et al. 2008). Enteroviruses can be detected and isolated in different non-treated and treated sources of water like sewage, river, borehole, spring, and dam water as well as in drinking water (Ehlers et al. 2005). Furthermore, after chlorine or UV treatments, gastroenteric viruses can replicate as well, and as a consequence, the inactivation procedure has to be adjusted depending on type of virus (Gerba et al. 2002; Li et al. 2009).

The identification of gastroenteric viruses in different environmental samples like sewage, surface, and marine water is well documented, especially in developed countries and are useful, because they reflect their circulating in a given geographic region; however, this information is scarce in developing countries like Uruguay (Pina et al. 1998; Calgua et al. 2008; Wyn-Jones et al. 2011). In this study, the distribution of RVA, NoV, and HAstV was determined, to our knowledge, for the first time in Uruguay by analyzing wastewater directly discharged to Uruguay River in four cities located in the Northwestern region of Uruguay.

Uruguay River conforms a large hydrographic boundary region, thus, constitutes an important geographical model to study the impact of human activity and environmental viral contamination of surface waters. The river covers a distance of approximately 1,838 km long, of which 1,262 km is located in Brazil and corresponds to the stretch between its headwaters and the confluence with Quaraí River. The remaining 576 km is located between Uruguay and Argentina and constitutes the border among both countries. Uruguay River waters pass through three different countries, each of them with their own climatic, demographic, ecological, and epidemiological characteristics. Five dams were built on the river to generate electricity, and 975,000 inhabitants are living on its shores. Historically, these populations have lived along the river and have exploited its wealth in various aspects like fisheries, navigation, energy production, as well as using its water for domestic consumption, irrigation, and recreation (C.A.R.U. 2013).

## Materials and Methods

### Area and Strategy of the Study

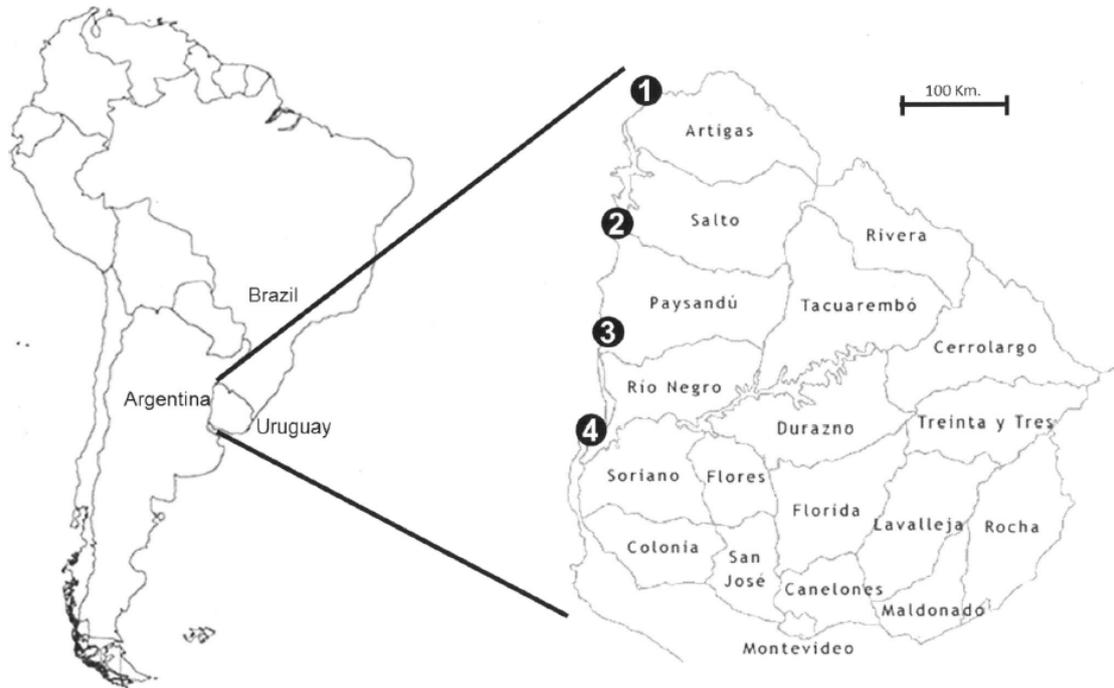
Uruguay River is located in South America and flows from North to South bordering Brazil, Argentina, and Uruguay, starting in Serra do Mar, Brazil. It flows between the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul in Brazil, from the Eastern border of the provinces of Misiones, Corrientes, and Entre Ríos in Argentina and makes up the Western borders of Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, Soriano, and Colonia departments in Uruguay (I.B.G.E. 2013; I.N.D.E.C. 2013; I.N.E. 2013).

The area of this study was demarked in the Northwest region of Uruguay including four cities: Bella Unión (30°15′59.55″S, 57°36′4.79″W), Salto (31°23′18.82″S, 57°58′35.09″W), Paysandú (32°19′38.38″S, 58°6′3.83″W), and Fray Bentos (33°7′8.95″S, 58°20′3.38″W) (Fig. 1). All these cities are located along Uruguay River covering three quarters of its extension in the Uruguayan territory with approximately 330 km between Bella Unión and Fray Bentos. One sampling collection site was determined in each city. Sewage samples from Salto, Paysandú, and Fray Bentos were collected in a collector which directly discharges untreated sewage into the river. Regarding Bella Unión, sewage samples (effluent) were collected downstream of the stabilization pond.

### Collection and Concentration of Wastewater Samples

42 ml of sewage sample ( $n = 96$ ) was collected biweekly in each city from March, 2011 to February, 2012. The samples were collected and rapidly refrigerated at 4 °C. They were immediately transported to the Molecular Virology Laboratory at Salto city in a maximum time of 3 h. The samples were kept at 4 °C and processed for viral concentration in the following 12 h and stored at −80 °C, until utilized for virus detection assays.

Viral concentration was carried out using ultracentrifugation methodology as described by Pina et al. (1998) with modifications added by Fumian et al. (2010). Briefly, 42 ml of sewage was ultracentrifuged at 100,000×g for 1 h at 4 °C. Viral particles were resuspended in 3.5 ml of 0.25 N glycine buffer (pH 9.5) and incubated on ice for 30 min. 3.5 ml of 2X phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) was added to neutralize the solution and was centrifuged at 12,000×g for 15 min. The supernatant was ultracentrifuged again at 100,000×g for 1 h at 4 °C, and 200 µl of 1X PBS was added to resuspend the pellet. All analyzed samples were spiked with 500 µl of a culture suspension containing PP7 bacteriophage, used as an internal control, kindly provided by Dr. Veronica Rajal from the National University of Salta, Argentina. The concentration of PP7 used was  $1 \times 10^8$  genomic copies/ml. The quantification of PP7 was performed



**Fig. 1** Map of collection sites (black circles with numbers) located in four cities along Uruguay River: Bella Unión (1), Salto (2), Paysandú (3), and Fray Bentos (4)

by real time PCR in the Laboratory of Comparative and Environmental Virology, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

#### Nucleic Acids Extraction and cDNA Synthesis

200  $\mu$ l of 1X PBS was added to the 200  $\mu$ l of the concentrated sample to obtain a final volume of 400  $\mu$ l in order to perform the nucleic acids extraction that was carried out using guanidium/silica method (Boom et al. 1990). Reverse transcription (RT) of the viral RNA was carried out with random hexamers (SBS Genetech<sup>TM</sup>) and *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Invitrogen<sup>TM</sup>) according to the manufacturer's instructions. In all the procedures, pure RNase- and DNase-free water was used as negative controls, and 10 % fecal suspension of RVA, NoV, and AstV previously characterized as GIP[8] (Accession number: K02033 and L34161), GII.4 (Accession number: JX975552), and HAstV-1 (Accession number: JQ796912), respectively, was used as positive controls.

#### Qualitative PCR for PP7 bacteriophage, Group A Rotaviruses, Noroviruses, and Human Astroviruses

For detection of the internal control (PP7), a qualitative PCR was performed in a final volume of 25  $\mu$ l containing

final concentration of 0.4  $\mu$ M of primers 247 f and 320 r, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 1U of *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>), and 5  $\mu$ l of cDNA. The amplification was performed with 40 cycles (94 °C, 30 s; 60 °C, 1 min; and 72 °C, 30 s) followed by a final extension at 72 °C for 10 min (Rajal et al. 2007).

Detection and genotyping of RVA were achieved by using qualitative multiplex semi-nested RT-PCR for VP4 and VP7 genes. The first round PCR for VP4 (primers 4con3 and 4con2) and VP7 (primers 9con1 and 9con2) genes was performed with the same reagents and concentration as described for PP7 PCR with the exception of 2.5  $\mu$ l of cDNA (WHO 2009b). The first round of VP4 and VP7 PCR was carried out with 35 cycles of 94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; and 72 °C, 1 min followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The second round multiplex-PCR for VP4 (4con3, 1T-1, 1T-1Wa, 1T1-VN, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1, ND2, p4943) and VP7 (9con1, 9T-1, 9T-2, 9T-3, 9T-4, 9T-9) was performed with the same reagent, concentration and cycling conditions as mentioned for the first round VP4 and VP7 PCR with the exception of 1  $\mu$ l of template.

NoV GI and GII detections were carried out using a semi-nested RT-PCR. The first round PCR with primers

**Table 1** Primers used for detection and typing of viruses by qualitative PCR

Virus	Primer	Sequence (5' → 3') <sup>a</sup>	Genome region	Amplicon size	Reference	
RV	9con1	TAGCTCCTTTAATGTATGG	VP7	904 bp	WHO 2009b	
	9con2	GTATAAAATACTTGCCACCA				
	9T-1	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	VP7	158 bp		
	9T-2	GTTAGAAATGATTCTCCACT	VP7	244 bp		
	9T-3	GTCCAGTTGCAGTGTAGC	VP7	484 bp		
	9T-4	GGGTCCGATGGAATAATTCT	VP7	403 bp		
	9T-9	TATAAAGTCCATTGCAC	VP7	110 bp		
	4con3	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	VP4	876 bp		WHO 2009b
	4con2	ATTTCCGGACCATTATAACC				
	1T-1	TCTACTGGATAACGTGC	VP4	345 bp		
	1T-1Wa	TCTACTGGGTTAACGTGC	VP4	345 bp		
	1T1-VN	TCTACTGGATCGACGTGC	VP4	345 bp		
	2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	VP4	483 bp		
	3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	VP4	267 bp		
	4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	VP4	391 bp		
	5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	VP4	583 bp		
	ND2	AGCGAACTCACC AATCTG	VP4	122 bp		
	p4943	GGTGTAGTTCCTGCGTA	VP4	543 bp		
	NoV	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	RNA polymerase	327 bp	Boxman et al. 2006
JV13I		TCATCATCACCATAGAAIGAG				
G1		TCNGAAATGGATGTTGG		187 bp		
HAstV	Noroll-R	AGCCAGTGGGCGATGGAATTC		236 bp	Noel et al. 1995	
	Mon269	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	ORF2	449 bp		
PP7	Mon270	TCAGATGCATTGTCATTGGT			Rajal et al. 2007	
	247 f	GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT	Replicase	73 bp		
	320 r	CGGGATGCCTCTGAAAAAAG				

RV rotavirus, NoV norovirus, HAstV human astrovirus, PP7 PP7 bacteriophage

<sup>a</sup> Degenerated primers and probes are as follows: Y: C or T; R: A or G; B: not A; N: any. W: A or T; K: G or T; S: G or C

JV12Y and JV13I detects both GI and GII strains. The second round PCR specific for GI strains was carried out with primers G1 and JV13I and for GII strains with primers JV12Y and NoroII-R. For both first and second round PCR, the same reagent and concentration as mentioned for PP7 PCR were used with the exception of 2 µl of template added in the second round PCR. The first round PCR was performed with 40 cycles of 94 °C, 30 s; 45 °C, 30 s; and 72 °C, 45 s followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The cycling conditions of the second round PCR were the same as the first round PCR with 35 cycles (Boxman et al. 2006)

Detection of HAstV by qualitative RT-PCR was performed with primers Mon269 and Mon270 with the same reagent and concentration as described for PP7 PCR. The cycling conditions were as follows: 40 cycles of 94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; and 72 °C, 1 min followed by a final extension at 72 °C for 10 min (Noel et al. 1995).

For details of primers used in qualitative PCRs see Table 1.

#### Quantitative PCR for Group A Rotaviruses, GII Noroviruses and Human Astroviruses

All quantitative PCRs (qPCR) were carried out with TaqMan<sup>®</sup> technology. Plasmids containing the insert for each virus analyzed in this study were kindly provided by Dr. T. Fumian from the Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil. All qPCR reactions were performed with SensiMix<sup>™</sup> II Probe Kit (Bioline Reagents Ltd.) and Rotor-Gene Q instrument (Qiagen<sup>®</sup>) following manufacturer's recommendations.

Genomic quantification of RVA by qPCR was performed with primers toward the NSP3 gene as described by Zeng et al. (2008) with a standard curve performed with nine points of serial dilutions of plasmid (10<sup>8</sup>–10<sup>0</sup> genomic

**Table 2** Primers and probes used for viral quantification by quantitative PCR

Virus	Primer/Probe	Sequence (5' → 3') <sup>a</sup>	Genome region	Amplicon size	Reference
RV	NSP3f	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	NSP3	86 bp	Zeng et al. 2008
	NSP3r	GGTCACATAACGCCCTATAGC			
	NSP3 probe	VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB			
NoV	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	ORF1-ORF2 junction	97 bp	Kageyama et al. 2003
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA			
HAstV	RING2-TP probe	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA	ORF1b	76 bp	Dai et al. 2010
	AstVF	CCDGCCAGRCTCACAGAAGAG			
	AstVR	GACTTGCTAGCCATCACACTYC			
	AstV probe	FAM-ACTCCATCGCATTGGAGGGGAG GACC-TAMRA			

RV rotavirus, NoV norovirus, HAstV human astrovirus

<sup>a</sup> Degenerated primers and probes are as follows: Y: C or G; B: not A; N: any. W: A or T; K: G or T; S: G or C

**Table 3** Frequency and concentration of group A rotavirus, norovirus, and human astrovirus according to collection sites along Uruguay River

City	Positive (%) / mean of concentration (g.c./l)		
	RVA	NoV	HAstV
Bella Unión	11 (46)/7.5 × 10 <sup>5</sup>	8 (33)/4.2 × 10 <sup>5</sup>	10 (42)/4.5 × 10 <sup>4</sup>
Salto	13 (54)/5.4 × 10 <sup>6</sup>	9 (38)/4.9 × 10 <sup>5</sup>	15 (63)/7.8 × 10 <sup>5</sup>
Paysandú	14 (58)/2.8 × 10 <sup>6</sup>	15 (63)/2.0 × 10 <sup>6</sup>	7 (29)/6.6 × 10 <sup>5</sup>
Fray Bentos	9 (38)/4.6 × 10 <sup>6</sup>	17 (71)/1.0 × 10 <sup>6</sup>	11 (46)/4.4 × 10 <sup>6</sup>
Total	47 (49)	49 (51)	43 (45)

g.c./l genomic copies per liter, RVA group A rotavirus, NoV norovirus, HAstV human astrovirus

copies/reaction (gc/r) that yield a slope of  $-3.59$  and a reaction efficiency of  $0.90$ .

Quantification of GII was achieved using the ORF1/ORF2 junction region with a standard curve performed with the same serial dilutions as the RVA quantification that yields a slope of  $-3.43$  and a PCR efficiency of  $0.96$  (Kageyama et al. 2003).

qPCR reactions for HAstV were carried out with primers directed to the ORF1b region and a standard curve with the same serial dilutions as RVA quantification (Dai et al. 2010). The slope of this standard curve was  $-3.31$ , and the efficiency of the reaction was  $1.01$ .

For details of primers and probes sequences, genome location and amplicon size see Table 2.

## Results

The high percentage ( $80\%$  [77/96]) of gastroenteric viruses detection reveals the spread of those viruses along Uruguay River. NoV was the most frequently detected with  $49$  ( $51\%$ ) positives samples, GII detected in all  $49$  samples, and GI detected in only  $7$  samples. RVA was the

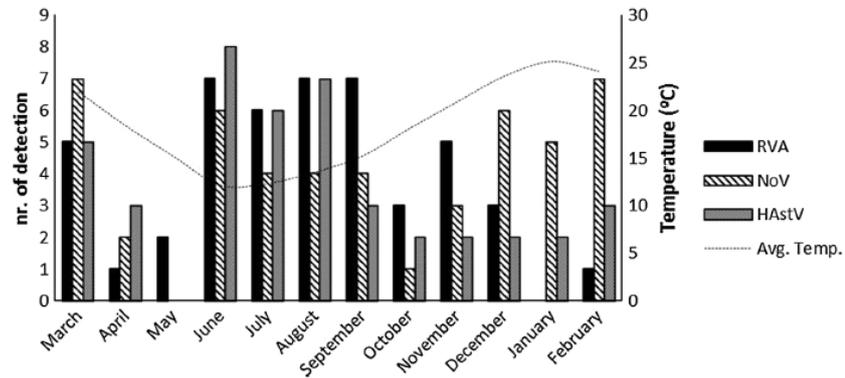
second more frequently detected virus with  $47$  ( $49\%$ ) positive samples followed by HAstV with  $43$  ( $45\%$ ) of the analyzed samples.

All investigated viruses were detected in the four cities studied with detection rates ranging from  $29$  to  $71\%$  according to the virus and the locality, although nearly the same frequency was observed in Salto ( $n = 37$ ,  $51\%$ ), Paysandú ( $n = 36$ ,  $50\%$ ), and Fray Bentos ( $n = 37$ ,  $51\%$ ) with a slightly low frequency identified in Bella Unión ( $n = 29$ ,  $40\%$ ) (Table 3).

The concentration determined by qPCR of each gastroenteric virus ranged between  $3.9 \times 10^3$  g.c./l and  $4.3 \times 10^7$  g.c./l for RVA, from  $3.2 \times 10^3$  to  $4.3 \times 10^7$  g.c./l for HAstV and for NoV, it varied from  $2.9 \times 10^3$  to  $3.8 \times 10^7$  g.c./l. A similar pattern of concentration for each virus was observed when analyzing each city with a mean ranging from  $10^4$  to  $10^6$  g.c./l; however, a slightly high concentration for RVA over the other viruses was observed in Bella Unión, Salto, Paysandú, and Fray Bentos (Table 3).

By using a multiplex semi-nested RT-PCR for RVA typing, the following genotypes were detected: P[8] ( $n = 15$ ), P[4] ( $n = 8$ ), P[10] ( $n = 1$ ), P[11] ( $n = 1$ ), G2

**Fig. 2** Distribution of group A rotaviruses, noroviruses, and human astroviruses according to the month of collection. The monthly average temperature registered in the area of the study is indicated by a *dash line*. *RVA* group A rotavirus, *NoV* norovirus, *HAsV* human astrovirus, *Avg. Temp.* average of the temperature



( $n = 29$ ), and G3 ( $n = 2$ ). PP7 bacteriophage was used as internal control and was detected in all analyzed samples.

A monthly distribution revealed a year round detection of all gastroenteric viruses except for NoV and HAsV that were absent in May and RVA in January. A pattern of seasonality during winter months (June to September) was observed for RVA and HAsV, whereas for NoV, no pattern of seasonality was observed (Fig. 2).

## Discussion

The results of this study reveal the presence of RVA, NoV, and HAsV in sewage directly discharged from four cities (Bella Unión, Salto, Paysandú, and Fray Bentos) into Uruguay River in Uruguay. To our best knowledge, this is the first study in Uruguay describing the presence, frequency, and seasonality of gastroenteric viruses in the environment. Up to this date, several methodologies have been used to concentrate viruses from different kinds of environmental waters, and the choice of the method is based mainly on the matrix to be analyzed (Vilaginès et al. 1993; Pina et al. 1998; Katayama et al. 2002; Calgua et al. 2008). The ultracentrifugation method was used in this study due to its worldwide use for concentrating gastroenteric viruses from sewage samples, since it is robust and simple (Nordgren et al. 2009; Fumian et al. 2010; Prata et al. 2012). Different viruses are used as internal control to evaluate the concentration step and the influence of these inhibitors on viral detection. In this work, we decided to inoculate PP7 bacteriophage in the sewage samples, since it is easy to cultivate and also for offering similar physico-chemical properties to gastroenteric viruses (Rajal et al. 2007). Prado et al. (2013) performed the recovery rate of PP7 by ultracentrifugation from sludge samples that was 12 %. In all analyzed samples, PP7 was detected after concentration confirming that the ultracentrifugation method is an excellent alternative to study gastroenteric

viruses in sewage samples with no interference of different inhibitors on viral detection.

The high percentage of detection and concentration of viruses up to  $10^7$  g.c./l is consistent with results obtained by direct investigation of sewage highlighting the microbiological contamination of Uruguay River and the impact of human occupation in the quality of water (Fumian et al. 2011; He et al. 2011). This is in agreement with similar results obtained in recent studies carried out in developed as well in developing countries, which determined a significant range of NoV positivity in sewage samples (La Rosa et al. 2010; Bucardo et al. 2011; Kitajima et al. 2012). The frequency of NoV detected in this study is higher than the frequency detected by He et al. (2011) in sewage from three sewage treatment plants in China. However, it was similar to the frequency detected in studies performed in Argentina and Brazil (Victoria et al. 2010; Blanco Fernández et al. 2011). On the other hand, La Rosa et al. (2010) identified nearly 100 % of positivity for NoV in the influent in five wastewater treatment plants in Italy. However, it is important to take in account that PCR methods performed for NoV detection in the previously mentioned studies were different, and the comparison between the percentages of positives is not linear, because some of these results can be augmented by the combination of more than one PCR methodology.

The frequency of RVA was surprising mainly due to several studies carried out in Latin America where RVA is generally the predominant virus in the environment reflecting the large number of cases that is still reported in those countries, even after the introduction of the rotavirus vaccine as occurred in Brazil (Miagostovich et al. 2008; Barril et al. 2010; Vieira et al. 2012; da Silva Soares et al. 2013; Degiuseppe et al. 2013; Fumian et al. 2013; Keller et al. 2013).

The multiplex semi-nested RT-PCR for detection and genotyping RVA present in sewage samples was performed, since it is important to determine the genotypes

present in the environment and to get an insight of the virus's epidemiology as well as surveillance of the dynamic of these genotypes in a country where a RVA vaccine has not yet been included in the national vaccination schedule. Although it is not possible to make an association between genotypes in environmental samples, it was interesting to note the predominance of genotypes P8 and G2 in the environment, which usually are not associated. In general, it has been observed that there is a global presence of human G1, G3, G4, G9 (commonly associated with P[8]), G2 that is generally associated with P[4] and G12 predominantly associated with either P[8] or P[6]; while P[10] and P[11] are considered as suspected human/animal reassortant strains mainly isolated from humans (Matthijssens et al. 2009). The predominance of G2 has also been observed in neighboring countries, and discussion on the influence of the vaccine on the dynamics of fluctuating RVA genotypes has been raised, mainly in Brazil (Leite et al. 2008; Degiuseppe et al. 2013). G2 genotype has been prevalent in clinical surveillance studies performed in Rio de Janeiro, Brazil and was widely detected in sewage samples collected in a sewage treatment plant located in the same city (Fumian et al. 2010; Carvalho-Costa et al. 2011). Unfortunately, only one report describing G genotypes in clinical samples collected between 1996 and 1999 was carried out in Uruguay highlighting the need of conducting further studies concerning the circulating RVA genotypes in order to determine the epidemiology of this virus in the pediatric population in this country (Berois et al. 2003).

HAsV presented the lowest frequency of the gastroenteric viruses analyzed in this study with 45 % of positivity. A higher frequency was observed in a study performed in Singapore where all sewage samples were positives; however, it was higher when compared with the detection rates observed in sewage treatment plants in Brazil and China. Similar results were observed concerning the quantification of positive samples (Aw and Gin, 2010; He et al. 2011; Fumian et al. 2013). This fluctuation of the frequency as well as the concentration of HAsV in sewage samples can be explained by the different methodology and genome targets used in these studies as well as by the different patterns of HAsV epidemiology in each analyzed country.

Although this is only a 1-year monitoring of these viruses in order to investigate its seasonality pattern, the detection peak for RVA and HAsV is frequently observed both in clinical and environmental surveillance, which leads us to think that it is likely that in colder months, both RVA and HAsV are frequently present in the pediatric population in those cities (Medici et al. 2012). On the other hand, no seasonality pattern was observed for NoV. This is in agreement with a recent study performed by Bucardo et al. (2011) which

detected NoV in Nicaragua throughout the year. Nevertheless, gastroenteritis cases due to NoV infections are generally associated with peaks of infections during the winter months in temperate countries like Uruguay (Karst 2010; Mounst et al. 2000). It must be taken into account that during environmental monitoring both symptomatic and asymptomatic cases of gastroenteritis caused by NoV infections are detected, and it is well known that a high prevalence of asymptomatic infections of NoV is frequently present in the population (Zhang et al. 2011).

This study demonstrated an elevated frequency of RVA, NoV, and HAsV in sewage samples collected in Uruguay (Bella Unión, Salto, Paysandú, and Fray Bentos), highlighting the need of investing in sewage treatment plants to reduce the impact of movement of virus in the population and the risk of acute gastroenteritis for the local population, since sewage is directly discharged in the waters of Uruguay River; widely used for recreation activities and also for drinking.

**Acknowledgments** We want to thank the financial support by the program "Polo de Desarrollo Universitario" (PDU), Universidad de la República (UdelAR), Uruguay; Project PCPP 023/2011 of "Coordinación de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES, Brazil), "Agencia Nacional de Investigación e Innovación" through project ANII-ALI-2009-1-1603 and project CSIC I + D 2010, Universidad de la República (UdelAR). We thank Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias and Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay, for technical assistance.

## References

- Aw, T. G., & Gin, K. Y. (2010). Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 716–730.
- Barreira, D. M., Ferreira, M. S., Fumian, T. M., Checon, R., de Sadosky, A. D., Leite, J. P., et al. (2010). Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *Journal of Clinical Virology*, 47(1), 60–64.
- Barril, P. A., Giordano, M. O., Isa, M. B., Masachessi, G., Ferreyra, L. J., Castello, A. A., et al. (2010). Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba Argentina. *Journal of Medical Virology*, 82(7), 1277–1281.
- Berois, M., Libersou, S., Russi, J., Arbiza, J., & Cohen, J. (2003). Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996–1999. *Journal of Medical Virology*, 71(3), 456–462.
- Black, R. E., Morris, S. S., & Bryce, J. (2003). Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*, 361(9376), 2226–2234.
- Blanco Fernández, M. D., Torres, C., Martínez, L. C., Giordano, M. O., Masachessi, G., Barril, P. A., et al. (2011). Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1631–1637.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple

- method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503.
- Boxman, I. L., Tilburg, J. J., Te Loeke, N. A., Vennema, H., Jonker, K., de Boer, E., et al. (2006). Detection of noroviruses in shellfish in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 391–396.
- Bucardo, F., Lindgren, P. E., Svensson, L., & Nordgren, J. (2011). Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PLoS ONE*, 6(10), e25962.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., et al. (2008). Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*, 153(2), 79–83.
- C.A.R.U. Comisión Administradora del Río Uruguay. (2013). El Río Uruguay en cifras. <http://www.caru.org.uy/web/acerca-de/prueba-pagina>. Accessed 15 October 2013.
- Carvalho-Costa, F. A., Volotão Ede, M., de Assis, R. M., Fialho, A. M., de Andrade Jda, S., Rocha, L. N., et al. (2011). Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005–2009. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(1 Suppl), S35–S41.
- Chan, M. C., Sung, J. J., Lam, R. K., Chan, P. K., Lee, N. L., Lai, R. W., et al. (2006). Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8), 1278–1280.
- Churgay, C. A., & Aftab, Z. (2012). Gastroenteritis in children: Part I Diagnosis. *American Family Physician*, 85(11), 1059–1062.
- da Silva Soares L, de Fátima Dos Santos Guerra S, do Socorro Lima de Oliveira A, da Silva Dos Santos F, de Fátima Costa de Menezes EM, Mascarenhas JD, Linhares AC. (2013). Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: High prevalence of G3P[6] genotype. *Journal of Medical Virology*, doi: 10.1002/jmv.23797.
- Dai, Y. C., Xu, Q. H., Wu, X. B., Hu, G. F., Tang, Y. L., Li, J. D., et al. (2010). Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City China. *Archives of Virology*, 155(6), 977–982.
- Degiuseppe, J. I., Giovacchini, C., & Stupka, J. A. (2013). Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis Virales. [Rotavirus epidemiology and surveillance in Argentina: 2009–2011]. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 111(2), 148–154.
- Desselberger, U. (1999). Rotavirus infections: Guidelines for treatment and prevention. *Drugs*, 58(3), 447–452.
- Ehlers, M. M., Grabow, W. O., & Pavlov, D. N. (2005). Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Research*, 39(11), 2253–2258.
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., & Arias, C. F. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, 42(10–11), 2618–2628.
- Fumian, T. M., Leite, J. P., Castello, A. A., Gaggero, A., Caillou, M. S., & Miagostovich, M. P. (2010). Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *Journal of Virological Methods*, 170(1–2), 42–46.
- Fumian, T. M., Leite, J. P., Rose, T. L., Prado, T., & Miagostovich, M. P. (2011). One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix<sup>®</sup> vaccine in Rio de Janeiro Brazil. *Water Research*, 45(17), 5755–5763.
- Fumian, T. M., Vieira, C. B., Leite, J. P., & Miagostovich, M. P. (2013). Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro Brazil. *Journal OF Water and Health*, 11(1), 110–119.
- Gallimore, C. I., Cubitt, D., du Plessis, N., & Gray, J. J. (2004). Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2271–2274.
- Gerba, C. P., Gramos, D. M., & Nwachuku, N. (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environment Microbiology*, 68(10), 5167–5169.
- He, X. Q., Cheng, L., Zhang, D. Y., Xie, X. M., Wang, D. H., & Wang, Z. (2011). One-year monthly survey of rotavirus, astrovirus and norovirus in three sewage treatment plants (STPs) in Beijing, China and associated health risk assessment. *Water Science and Technology*, 64(6), 1202–1210.
- I.B.G.E. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2013). <http://www.ibge.gov.br/home/>. Accessed 15 October 2013.
- I.N.D.E.C. Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2013). <http://www.indec.mecon.ar/>. Accessed 15 October 2013.
- I.N.E. Instituto Nacional de Estadística. (2013). <http://www.ine.gub.uy/>. Accessed 15 October 2013.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., et al. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1548–1557.
- Karst, S. M. (2010). Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*, 2(3), 748–781.
- Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environment Microbiology*, 68(3), 1033–1039.
- Keller, R., Justino, J. F., & Cassini, S. T. (2013). Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitória Brazil. *Journal of Water and Health*, 11(3), 573–580.
- Kitajima, M., Haramoto, E., Phanuwat, C., Katayama, H., & Furumai, H. (2012). Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3), 605–613.
- La Rosa, G., Iaconelli, M., Pourshaban, M., & Muscillo, M. (2010). Detection and molecular characterization of noroviruses from five sewage treatment plants in central Italy. *Water Research*, 44(6), 1777–1784.
- Leite, J. P., Carvalho-Costa, F. A., & Linhares, A. C. (2008). Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8), 745–753.
- Li, D., Gu, A. Z., He, M., Shi, H. C., & Yang, W. (2009). UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. *Water Research*, 43(13), 3261–3269.
- Mathijnsens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman, M., et al. (2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiology*, 4(10), 1303–1316.
- Medici, M. C., Tummolo, F., Albonetti, V., Abelli, L. A., Chezzi, C., & Calderaro, A. (2012). Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008–2009. *Journal of Medical Virology*, 84(4), 643–650.
- Miagostovich, M. P., Ferreira, F. F., Guimarães, F. R., Fumian, T. M., Diniz-Mendes, L., Luz, S. L., et al. (2008). Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 375–382.
- Mounts, A. W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J. S., Noel, J., & Glass, R. I. (2000). Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181(Suppl 2), S284–S287.

- Noel, J. S., Lee, T. W., Kurtz, J. B., Glass, R. I., & Monroe, S. S. (1995). Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(4), 797–801.
- 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.
- O’Ryan, M. L., Lucero, Y., Prado, V., Santolaya, M. E., Rabello, M., Solis, Y., et al. (2009). Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *28*(10), 879–884.
- Payne, D. C., Vinjé, J., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Weinberg, G. A., et al. (2013). Norovirus and medically attended gastroenteritis in US children. *New England Journal of Medicine*, *368*(12), 1121–1130.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H., & Girones, R. (1998). Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and Environment Microbiology*, *64*(11), 4485–4488.
- Prado, T., Guilayn Wde, C., Gaspar, A. M., & Miagostovich, M. P. (2013). The efficiency of concentration methods used to detect enteric viruses in anaerobically digested sludge. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *108*(1), 77–83.
- Prata, C., Ribeiro, A., Cunha, Â., Gomes, N. C., & Almeida, A. (2012). Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. *Journal of Environmental Monitoring*, *14*(1), 64–70.
- Rajal, V. B., McSwain, B. S., Thompson, D. E., Leutenegger, C. M., Kildare, B. J., & Wuertz, S. (2007). Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research*, *41*(7), 1411–1422.
- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., et al. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and Environment Microbiology*, *77*(19), 6884–6888.
- Teunis, P. F., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., et al. (2008). Norwalk virus: how infectious is it? *Journal of Medical Virology*, *80*(8), 1468–1476.
- Victoria, M., Guimarães, F. R., Fumian, T. M., Ferreira, F. F., Vieira, C. B., Shubo, T., et al. (2010). One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro Brazil. *Journal of Water and Health*, *8*(1), 158–165.
- Vieira, C. B., Mendes, A. C., Guimarães, F. R., Fumian, T. M., Leite, J. P., Gaspar, A. M., et al. (2012). Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *107*(6), 778–784.
- Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson, G., & Vilaginès, R. (1993). Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Science and Technology*, *27*(3–4), 299–306.
- Wazny, K., Zipursky, A., Black, R., Curtis, V., Duggan, C., Guerrant, R., et al. (2013). Setting research priorities to reduce mortality and morbidity of childhood diarrhoeal disease in the next 15 years. *PLoS Medicine*, *10*(5), e1001446.
- World Health Organization (2009a). Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done.
- World Health Organization (2009b). Manual of rotavirus detection and characterization methods.
- Wyn-Jones, A. P., Carducci, A., Cook, N., D’Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., et al. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*, *45*(3), 1025–1038.
- Zeng, S. Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E. D., Puustinen, L., & Vesikari, T. (2008). One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, *153*(2), 238–240.
- Zhang, S., Chen, T. H., Wang, J., Dong, C., Pan, J., Moe, C., et al. (2011). Symptomatic and asymptomatic infections of rotavirus, norovirus, and adenovirus among hospitalized children in Xi’an China. *Journal of Medical Virology*, *83*(8), 1476–1484.

**4.2 – Detección de cepas recombinantes de NV a partir de muestras clínicas colectadas en casos de GAI durante el primer año de muestreo realizado en Salto (Artículo 2). (Vinculado a objetivo específico 3.2.2)**

Infection, Genetics and Evolution 28 (2014) 328–332

Contents lists available at ScienceDirect

**Infection, Genetics and Evolution**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

ELSEVIER

MEEGID  
Infection, Genetics and Evolution

Short communication

Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant 

Álvaro Fajardo<sup>a</sup>, Fernando López Tort<sup>b</sup>, Matías Victoria<sup>b</sup>, Tulio M. Fumian<sup>c</sup>, Marize P. Miagostovich<sup>c</sup>, José Paulo G. Leite<sup>c</sup>, Juan Cristina<sup>a</sup>, Rodney Colina<sup>b,\*</sup>

**Objetivos:**

- Investigar la presencia de posibles cepas recombinantes de NV mediante una metodología de PCR que amplifica la región donde ocurren con mayor frecuencia estos eventos: región de unión ORF1/ORF2.
- Analizar 6 muestras clínicas de casos de GAI de Salto previamente detectadas positivas para NV mediante una metodología de PCR que amplifica una región de la ORF1 (región B), colectadas durante el primer año de muestreo.
- Investigar la presencia de eventos de recombinación y el posible punto de recombinación mediante uso de diferentes programas bioinformáticos (análisis *in silico*) diseñados con este fin, para validar y dar soporte a los resultados que se obtengan.

**Revista:** *Infection, Genetics and Evolution* (2014), 28: 328-332.



## Short communication

## Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant



Álvaro Fajardo<sup>a</sup>, Fernando López Tort<sup>b</sup>, Matías Victoria<sup>b</sup>, Tulio M. Fumian<sup>c</sup>, Marize P. Miagostovich<sup>c</sup>, José Paulo G. Leite<sup>c</sup>, Juan Cristina<sup>a</sup>, Rodney Colina<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup>Laboratorio de Virología Molecular, Regional Norte, Universidad de la República, Gral. Rivera 1350, 50000 Salto, Uruguay

<sup>c</sup>Laboratorio de Virología Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Avenida Brasil, 4365 – Pav. Helio & Peggy Pereira, 21040-360 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 September 2014

Received in revised form 22 October 2014

Accepted 27 October 2014

Available online 4 November 2014

## Keywords:

Norovirus  
Recombination  
Evolution

## ABSTRACT

Noroviruses (NoV) are one of the major etiological agent of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks worldwide. Distinct NoV genotypes have been associated with different transmission patterns and disease severity in humans. Therefore, it is important to identify genetically different NoV genotypes circulating in a particular region. However, genotyping has become a challenge due to recombination events occurring mainly nearby ORF1/ORF2 junction of NoV genome, leading to distinct genotypes with polymerase and capsid regions derived from parenteral strains. Taking this into account, ORF1/ORF2 sequences were obtained from NoV strains collected from patients with AGE in Uruguay. This study reveals *in silico* evidences of recombination events taking place in four out of six strains analyzed for which its polymerase gene and its capsid region correspond to GII.P7 and to GII.6 genotype, respectively. These results also reveal the circulation of a GII.P7/GII.6 recombinant variant in the natural populations of NoV strains in the northwestern region of Uruguay. As far as we know this is the first report about the circulation of a NoV GII.P7/GII.6 recombinant variant in the Americas.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Noroviruses (NoV), belonging to genus *Norovirus*, family *Caliciviridae*, are a group of related, single-stranded RNA, non-enveloped viruses that cause acute gastroenteritis (AGE) in humans (Green et al., 2000; Xi et al., 1990). NoV are responsible for 50% of all AGE outbreaks, especially in developing countries, where they cause annually one million hospitalizations and 200,000 deaths in children under 5 years old (Patel et al., 2008).

NoV genome is organized into three open reading frames (ORFs). ORF1 is translated as a large polyprotein, which is co and post-translationally cleaved to release at least six mature non-structural (NS) proteins, including the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Hyde et al., 2009; Hyde and Mackenzie, 2010). ORF2 and ORF3 are translated from a subgenomic RNA, and encode the major and minor capsid proteins, VP1 and VP2, respectively (Thorne and Goodfellow, 2014). Based on their nucleotide capsid VP1 and polymerase sequences, NoV are classified into seven genogroups (GI to GVII) of which GI, GII and GIV have been described in humans, and recently, GVI and GVII were detected in canine and feline species. (Kroneman et al., 2013).

NoV can be further classified into at least 32 different genotypes, which can differ in their ability to cause epidemics, their host range, incidence, virulence and stability in the environment (Fankhauser et al., 2002; Huhti et al., 2011; Kroneman et al., 2008, 2013; Vinjé et al., 2004).

Recombination is one of the main driving forces shaping evolution of viruses (Bull et al., 2007). It provides RNA viruses with an attractive mechanism to adapt to new environmental conditions and hosts, and therefore, to evade the immune system (Van der Walt et al., 2009). It has been experimentally demonstrated the occurrence of a homologous recombination event located at the ORF1/ORF2 overlap, in murine NoV (Mathijs et al., 2010). Several recombination events have been reported worldwide among NoV strains, leading to difficulties in genotyping and molecular epidemiologic studies. It has been well documented that a recombination hotspot is present around the ORF1/ORF2 junction of NoV genome, where a highly conserved sequence of 28 bp-long (5'-GTG AAT GAA GAT GGC GTC KAR YGA CGC Y-3') and 27 bp-long (5'-GYR AAT GAT GAT GGC GTC KAA RGA CGY-3') is present for NoV GII and NoV GI, respectively, that seems to play an important role (Bull et al., 2005; Han et al., 2004; Hansman et al., 2004; Hardy et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +598 473 34816; fax: +598 473 22154.

E-mail address: [rodneycolina1@gmail.com](mailto:rodneycolina1@gmail.com) (R. Colina).

1997; Jiang et al., 1999; Katayama et al., 2002, 2004; Oliver et al., 2004).

In order to determine the presence of putative recombination events among NoV populations circulating in Uruguay, three diarrheic stool samples and three vomit samples, which were previously diagnosed positive for NoV by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) of the B region (Fankhauser et al., 2002) were studied. These samples were obtained during a surveillance study conducted between May 2011 and May 2012 from Uruguayan patients with AGE in the city of Salto, North-Western Uruguay (for details see Table 1). Voluntary written informed consent were obtained from the parents or legal guardians at enrollment. The study has been accepted by the local health authorities.

Nucleic acids were extracted using the guanidine isothiocyanate-silica method from a 10% fecal suspension in pH 7.2 Tris-calcium buffer (Boom et al., 1990). Complementary DNA (cDNA) was obtained using hexanucleotide random primers (Amersham Bioscience, UK) and the *Superscript III™ reverse transcriptase* (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. In order to investigate the presence of putative recombination events within the analyzed strains, we performed a PCR targeting the overlapping region between ORF1 and ORF2 using primers (Mon431/432; G2SKR/G1SKR) and protocols previously described (Beuret et al., 2002; Fumian et al., 2012; Kojima et al., 2002). An amplicon of 564 bp was obtained and visualized by agarose gel electrophoresis. This amplicon include a 285 bp region present at the 3' end of ORF1, coding for the RNA polymerase, and 279 bp corresponding to the 5' end of ORF2, which codes for the capsid protein.

Amplicons were purified using *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen™), according to manufacturer's instructions. Bidirectional DNA sequencing was performed by the dideoxynucleotide chain termination method, using the *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1*, v. 3.1 and the *ABI Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) by the Genomic Platform of DNA sequencing PDTIS/Fiocruz. The sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database under accession numbers KJ577799–KJ577802 and KJ865752–KJ865753.

The obtained sequences were first analyzed with the Seqman program implemented in the *DNASTar 5.01 package* (DNASTAR, Madison, USA). Comparable sequences containing ORF1/ORF2 overlap of different NoV genotypes were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Alignment of sequences was performed using the MUSCLE program (Edgar, 2004). Sequences were analyzed with the *Norovirus Genotyping Tool*, v1.0 (Kroneman et al., 2011) in order to determine their genotypes. Due to the possibility of recombination events in the analyzed region, two datasets were generated: one considering the region coding for the RdRp (partial ORF1) and the other including capsid coding region (partial ORF2). Phylogenetic analyses were performed for both datasets that included comparable sequences of different NoV genotypes. The program Modelgenerator (Keane et al., 2006) was used to identify the optimal evolutionary model for both datasets. Akaike Information Criteria and

Hierarchical Likelihood Ratio Test indicated that the GTR +  $\Gamma$  model fit the sequence data. Using this model, Maximum Likelihood (ML) trees were constructed using software from the PhyML program (Guindon et al., 2005). As a measure of the robustness of each node, we employed an approximate Likelihood Ratio Test (aLRT) to assesses that the branch being studied provides a significant likelihood gain, in comparison with the null hypothesis that involves collapsing that branch but leaving the rest of the tree topology identical (Anisimova and Gascuel, 2006).

Splits networks were created with SplitsTree 4.13.1 (Huson and Bryant, 2006) using the neighbor-net method (Bryant and Moulton, 2004). Neighbor-net depicts conflicting phylogenetic signals in the data that are caused by recombination as cycles within unrooted bifurcating trees. The presence of recombination events was statistically verified after visual identification using the pairwise homoplasy test (PHI). PHI has been shown to powerfully identify the presence/absence of recombination within a wide range of sequence samples with a low false positive rate (Bruen et al., 2006).

SimPlot version 3.5.1 (Lole et al., 1999) was used to perform the recombination breakpoint analyses. SimPlot analysis was performed by setting the window width and the step size to 200 bp and 20 bp, respectively. We also used different methods implemented in the Recombination Detection Program v.4.16 (RDP4) (Martin et al., 2010), such as Bootscan/Recscan (Martin et al., 2005), RDP (Martin and Rybicki, 2000), and MaxChi (Smith, 1992). Uruguayan sequences KJ577799 to KJ577802 were included as queries, while genotype GII.6 (AB039778) and GII.7 (AB258331) sequences were used as putative parental sequences.

The results of the analysis performed using the *Norovirus Genotyping Tool* suggests that two of the Uruguayan strains belong to genotypes GII.1 and GII.4 (KJ865752 and KJ865753, respectively). Surprisingly, the analysis of the other four Uruguayan strains (KJ577799–KJ577802) indicated incongruence between their genotype classification based on ORF1 and ORF2 regions, which grouped them into GII.P7 and GII.6, respectively (Supplementary Table 1).

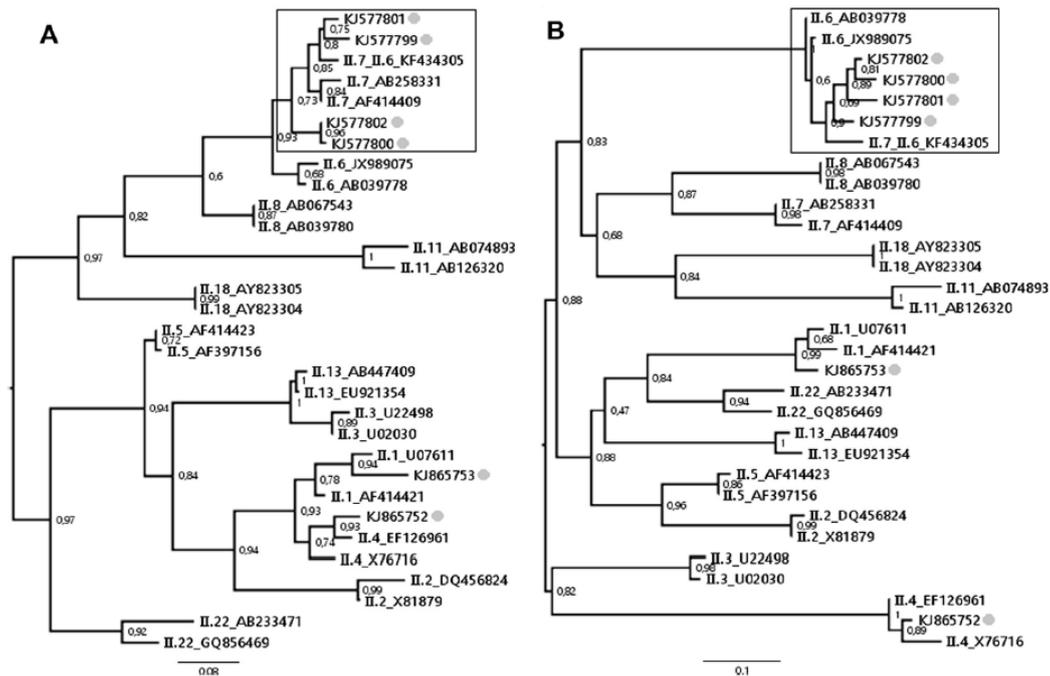
In order to confirm the results obtained using the *Norovirus Genotyping Tool*, ML phylogenetic trees were constructed (Fig. 1). Again, a close genetic relation among Uruguayan KJ865752 and KJ865753 strains with previously described GII.1 and GII.4 genotypes, respectively, was found. The other four Uruguayan strains (KJ577799–KJ577802) were assigned to clusters composed of previously described GII.P7 genotype, respectively, for ORF1 (RdRp) sequences (see Fig. 1A). Nevertheless, when the same analysis was performed using ORF2 (VP1) sequences, a clear genetic relation among these four Uruguayan strains and GII.6 genotype was found (see Fig. 1B).

With the objective to analyze the possible recombination events occurring among the Uruguayan strains, the 564 bp alignment containing the ORF1/ORF2 junction was explored using neighbor-net method implemented in SplitsTree 4.13.1. A reticulate phylogenetic network was evident, due to the presence of conflicting phylogenetic signals within the sequences (Supplementary Fig. 1). We statistically verified the presence of recombination events identified visually in phylogenetic graphs using the PHI test,

**Table 1**  
Characteristics of the samples analyzed.

Strain number	Type of sample	Sex	Age	Isolation date	Genotype	Accession number
70	Feces	F	NA	05/2011	GII.7/GII.6	KJ577799
93	Feces	M	NA	06/2011	GII.7/GII.6	KJ577800
234	Feces	M	6 years	04/2012	GII.7/GII.6	KJ577801
243	Vomit	F	25 years	05/2012	GII.7/GII.6	KJ577802
178	Vomit	F	9 years	03/2012	GII.4	KJ865752
229	Vomit	M	4 years	04/2012	GII.1	KJ865753

NA: not available.



**Fig. 1.** Maximum likelihood phylogenetic tree analysis of NoV strains isolated in Uruguay. Strains previously reported are shown by their genotype followed by their accession numbers. Strains isolated in Uruguay are shown by their accession numbers highlighted in gray. The clusters where Uruguayan strains have been assigned are indicated by a frame. Numbers at the branches show aLRT values. Bars at the bottom of the trees indicate nucleotide Distance. The results obtained using partial ORF1 and ORF2 regions are shown in (A) and (B), respectively.

which confirmed that these conflicting signals are due to recombination (statistic-value < 0.001).

In order to identify the precise location of the putative recombination breakpoint that was suggested by the results of the previous phylogenetic analyses, we employed different methods implemented in SimPlot and RDP4 programs to analyze the ORF1/ORF2 junction for the four potentially recombinant samples involved in this study. The results of these analyzes are shown in Fig. 2.

As expected, SimPlot analysis revealed the presence of recombination break-points at positions 208–214 of Uruguayan NoV KJ577799, KJ577800, KJ577801 and KJ577802 (see Fig. 2A). These positions correspond to nucleotides 5027–5033 relative to reference strain Lordsdale (accession number X86557).

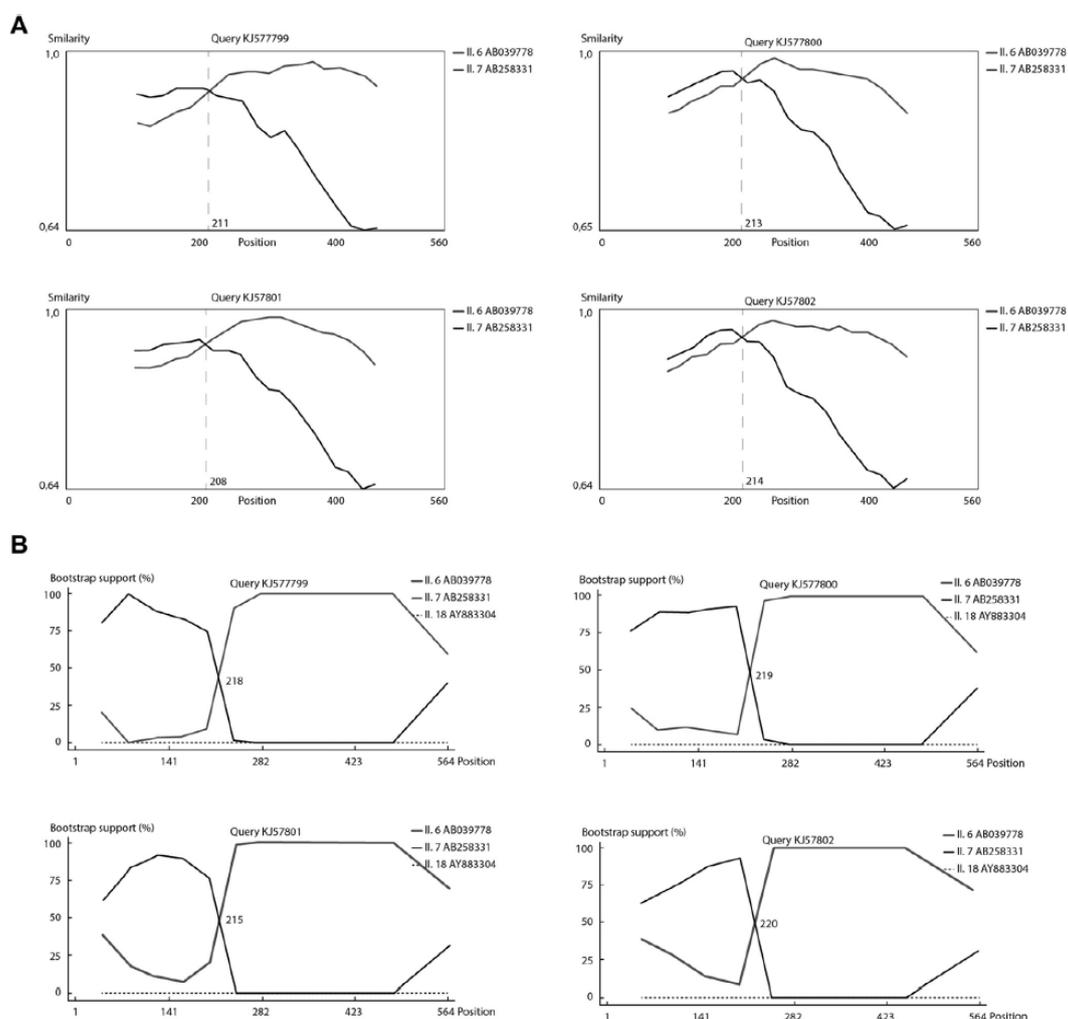
Finally, to validate SimPlot results, Bootscan/Recscan analysis, implemented in RDP4 program, was employed. As it shown in Fig. 2B, similar results were found using both approaches; since recombination break-points were detected at positions 215 and 220 of the same four Uruguayan NoV strains (positions 5034–5039 relative to reference strain Lordsdale, accession number X86557). The recombination points determined by other methods implemented in RDP4 program (RDP and MaxChi), showed similar results (data not shown).

In this study, we explored the genetic variability of NoV strains circulating in the northwest region of Uruguay, through sequence analysis of their ORF1/ORF2 junction region. We could appreciate the presence of conflicting phylogenetic signals among four of the six strains analyzed, indicating that RdRp and capsid genes could have derived from different ancestral strains. This fact suggested that the strains analyzed may have emerged as a result of a recombination event between GII.7 and GII.6 strains. This hypothesis was further investigated through different approaches.

The results of these studies revealed recombination break-points between positions 5027–5039 of the NoV genome (relative to reference strain Lordsdale) in four out of six NoV strains collected in Uruguay. This is in agreement with previous reports describing NoV recombinant strains, where the recombination breakpoints were estimated between nucleotides 4981 and 5117 (Bull et al., 2005; Fumian et al., 2012; Hansman et al., 2004; Hardy et al., 1997; Jiang et al., 1999; Katayama et al., 2002).

The presence of a recombination hotspot around ORF1/ORF2 junction of NoV genome seems to be related with the presence of a highly conserved sequence in this region, which is also present at the 5' end of ORF1 (Bull et al., 2005). A conserved sequence of 28 bp (5'-GTG AAT GAA GAT GGC GTC GAA TGA CGC Y-3') was observed in all Uruguayan strains. This sequence has been suggested to form a stem loop structure that acts as a RNA promoter sequence, playing a significant role for the recombination events to occur (Bull et al., 2005; Kao et al., 2001; Miller et al., 1985; Morales et al., 2004; Pletneva et al., 2001).

The results of these studies highlight the importance of carrying out a deeper NoV surveillance studies in order to perform appropriate epidemiological analyses and constitute the first evidence about the circulation of this specific genetic variant in the Americas. More studies will be needed to address the extent and the role of recombination in NoV populations circulating in the South American region. The only GII.7/GII.6 recombinant strain reported to date was recently detected in Burkina Faso (accession number KF434305) (Huynen et al., 2013). This strain was also analyzed in the present work and presented high similarity to Uruguayan strains, both in its phylogenetic signal and in its recombination pattern. However, taking into account the high frequency of recombination in this genomic region of NoV, as well as the



**Fig. 2.** Determination of recombination breakpoints. (A) SimPlot analysis results. The y-axis gives the percentage of identity within a sliding window of 200 bp wide, with a step size between plots of 20 bp. Comparison of the 4 Uruguayan strains with their putative parental NoV strains of genotypes GII.6 (AB039778) and GII.7 (AB258331) is indicated by gray and black lines, respectively. The vertical dashed lines indicate the recombination break-point site. (B) Bootscan/Reccan analysis results. The y-axis gives the percentage of bootstrap support values of permuted trees using a sliding window of 200 bp wide with a step size between plots of 20 bp. Uruguayan sequences were analyzed with strains genotype GII.6 (AB039778) and genotype GII.7 (AB258331), as putative parental strains, and a GII.18 strain (AY883304) as an outlier sequence, indicated in gray, black and dotted lines, respectively. The recombination break-point position for each case is indicated.

geographical distance between the strains considered, a direct relation between these recombinant events seems unlikely. A more feasible scenario could be a consequence of the circulation of both GII.6 and GII.7 genotypes in a particular area. Co-circulation of different NoV genotypes may lead to co-infection, increasing the possibility of recombination events and giving rise to the circulation of new recombinant strains (Jiang et al., 1999; Vidal et al., 2006). Therefore, deeper research concerning NoV genotypes circulating in northwestern region of Uruguay and surrounding areas, are essential in order to understand the origin and dynamics of the reported recombinants. Furthermore, we report the circulation of the globally detected GII.1 and GII.4, based on its identification in two of the analyzed strains. However, the relative distribution

of these genotypes and their prevalence will require more intensive molecular epidemiologic studies in Uruguay. This studies, together with reports of this nature in neighbor countries (Vidal et al., 2006; Fioretti et al., 2011, 2004; Gomes et al., 2008), will provide us a better understanding of the behavior and spread of NoV genotypes in the Latin American region.

**Acknowledgments**

This work was supported by projects from: Program “Polo de Desarrollo Universitario” (PDU), Universidad de República (UdelaR), Uruguay. Project CSIC I + D 2010, Universidad de la República (UdelaR) and project PCPP 023/2011 of “Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES-ANII, Brazil/Uruguay).

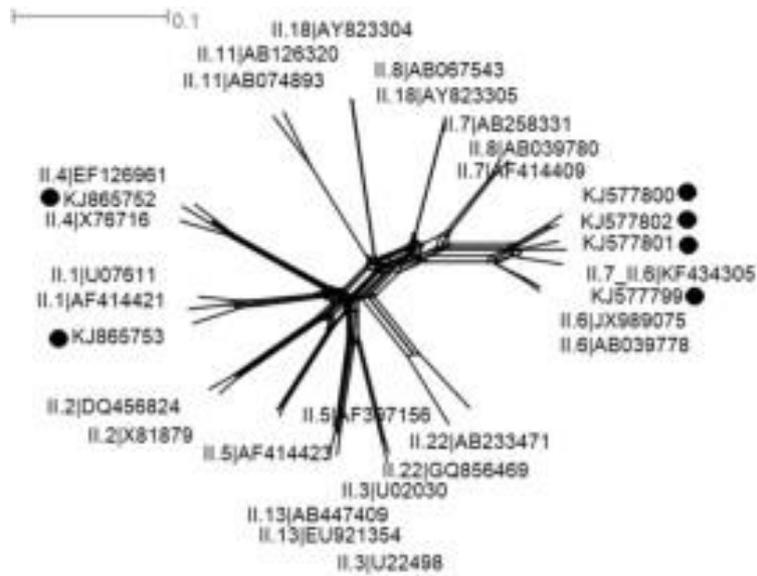
A.F. acknowledges financial support for Ph.D. studies from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay, Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) – PPCP 023/2011. Program of Research Excellence (PROEP) – Brazilian National Council for Scientific and Technological Development and Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, and Carlos Chagas Filho Foundation for research support of the state of Rio de Janeiro (FAPERJ).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.026>.

#### References

- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Luthi, T.M., 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1925–1931.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Bruen, T.C., Philippe, H., Bryant, D., 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172, 2665–2681.
- Bryant, D., Moulton, V., 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 21, 255–265.
- Bull, R.A., Hansman, G.S., Clancy, L.E., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1079–1085.
- Bull, R.A., Tanaka, M.M., White, P.A., 2007. Norovirus recombination. *J. Gen. Virol.* 88, 3347–3359.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Noel, J.S., Humphrey, C.D., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Ando, T., Glass, R.L., 2002. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 186, 1–7.
- Fioretti, J.M., Bello, G., Rocha, M.S., Victoria, M., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2004. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS ONE* 9, e92988.
- Fioretti, J.M., Ferreira, M.S., Victoria, M., Vieira, C.B., Xavier, M.P., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2011. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 942–947.
- Fumian, T.M., Aragao, G.C., Mascarenhas, J.D.P., Kaiano, J.H., Siqueira, J.A.M., Soares, L.S., Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., 2012. Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch. Virol.* 157, 2389–2392.
- Gomes, K.A., Stupka, J.A., Diana, A., Parra, G.L., 2008. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006. *Rev. Argent. Microbiol.* 40, 222–228.
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 181, S322–S330.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O., 2005. PHYML Online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33, W557–W559.
- Han, M.G., Smiley, J.R., Thomas, C., Saif, L.J., 2004. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5214–5224.
- Hansman, G.S., Katayama, K., Peerakome, N., Khamrin, P., Tonusin, S., Okitsu, S., Nishio, O., Takeda, N., Ushijima, H., 2004. Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1305–1307.
- Hardy, M.E., Kramer, S.E., Treanor, J.J., Estes, M.K., 1997. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch. Virol.* 142, 1469–1479.
- 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. *J. Infect. Dis.* 203, 1442–1444.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Huynen, P., Mauroy, A., Martín, C., Savadogo, L.G., Boreux, R., Thiry, E., Melin, P., De Mol, P., 2013. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J. Clin. Virol.* 58, 515–521.
- Hyde, J.L., Mackenzie, J.M., 2010. Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology* 406, 138–148.
- Hyde, J.L., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., Wobus, C., Virgin, H.W., Mackenzie, J.M., 2009. Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J. Virol.* 83, 9709–9719.
- Jiang, X., Espul, C., Zhong, W.M., Cuello, H., Matson, D.O., 1999. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch. Virol.* 144, 2377–2387.
- Kao, C.C., Singh, P., Ecker, D.J., 2001. De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology* 287, 251–260.
- Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F.B., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., Takeda, N., 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299, 225–239.
- Katayama, K., Miyoshi, T., Uchino, K., Oka, T., Tanaka, T., Takeda, N., Hansman, G.S., 2004. Novel recombinant sapovirus. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1874–1876.
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., 2006. Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29.
- Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K., 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 100, 107–114.
- Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., Van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Böttiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., Von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Galloway, A., Schreier, E., Höhne, M., Koch, J., Szűcs, G., Reuter, G., Kriztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Mijovski, J.Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernández-Pezzi, G., Hedlund, K.O., Koopmans, M., 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2959–2965.
- Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H.V., Peñaranda, S., Oberste, M.S., Vinjé, J., Koopmans, M., 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* 51, 121–125.
- 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. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.
- Martin, D., Rybicki, E., 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16, 562–563.
- Martin, D.P., Posada, D., Crandall, K.A., Williamson, C., 2005. A modified Bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 98–102.
- Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefevre, P., 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462–2463.
- Mathijs, E., Muylkens, B., Mauroy, A., Ziant, D., Delwiche, T., Thiry, E., 2010. Experimental evidence of recombination in murine noroviruses. *J. Gen. Virol.* 91, 2723–2733.
- Miller, W.A., Dreher, T.W., Hall, T.C., 1985. Synthesis of bromo mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (–) sense genomic RNA. *Nature* 313, 68–70.
- Morales, M., Barcena, J., Ramirez, M.A., Boga, J.A., Parra, F., Torres, J.M., 2004. Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (–) sense genomic RNA. *J. Biol. Chem.* 279, 17013–17018.
- Oliver, S.L., Brown, D.W., Green, J., Bridger, J.C., 2004. A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* 326, 231–239.
- Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1224–1231.
- Pletneva, M.A., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., 2001. The genome of Hawaii virus and its relationship with other members of the Caliciviridae. *Virus Genes* 23, 5–16.
- Smith, J.M., 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* 34, 126–129.
- Thorne, L.G., Goodfellow, I.G., 2014. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 95, 278–291.
- Van der Walt, E., Rybicki, E., Varsani, A., Polston, J.E., Billharz, R., Donaldson, L., Monjane, A.L., Martin, D.P., 2009. Rapid host adaptation by extensive recombination. *J. Gen. Virol.* 3, 734–746.
- Vidal, R., Roessler, P., Solari, V., Vollaize, J., Jiang, X., Matson, D.O., Mamani, N., Prado, V., O’Ryan, M.L., 2006. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2271–2275.
- 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. *J. Virol. Methods* 116, 109–117.
- Xi, J.N., Graham, D.Y., Wang, K.N., Estes, M.K., 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250, 1580–1583.



**Supplementary Fig. 1.** Neighbor-net analysis of NV strains. Strains previously reported are shown by their genotype followed by their accession numbers. Strains isolated in Uruguay are shown by their accession numbers and indicated by a black circle. The PHI test suggested statistically significant evidence for recombination ( $p = 1.433E-4$ ). Scale bar indicate number of nucleotide substitutions per site.

**Supplementary Table 1.** Supplementary norovirus genotyping tool analysis.

name	length	ORF1	ORF2	begin	end	genogroup	ORF1 genotype	ORF1 genotype support	ORF2 genotype	ORF2 genotype support
KJ577799	564	GII.P7	GII.6	4819	5383	NoV II	GII.P7	99	GII.6	100
KJ577800	564	GII.P7	GII.6	4819	5383	NoV II	GII.P7	98	GII.6	100
KJ577801	564	GII.P7	GII.6	4819	5383	NoV II	GII.P7	93	GII.6	100
KJ577802	564	GII.P7	GII.6	4819	5383	NoV II	GII.P7	98	GII.6	100
KJ865752	564	GII.P4	GII.4	4819	5383	NoV II	GII.P4	99	GII.4	100
KJ865753	564	GII.P1	GII.1	4819	5383	NoV II	GII.P1	99	GII.1	100
II.1 AF414421	564	GII.P1	GII.1	4819	5383	NoV II	GII.P1	99	GII.1	100
II.1 U07611	564	GII.P1	GII.1	4819	5383	NoV II	GII.P1	100	GII.1	100
II.2 X81879	564	GII.P2	GII.2	4819	5383	NoV II	GII.P2	100	GII.2	100
II.2 DQ456824	564	GII.P2	GII.2	4819	5383	NoV II	GII.P2	99	GII.2	100
II.3 U02030	564	GII.P3	GII.3	4819	5383	NoV II	GII.P3	100	GII.3	100
II.3 U22498	564	GII.P3	GII.3	4819	5383	NoV II	GII.P3	100	GII.3	100
II.4 X76716	564	GII.P4	GII.4	4819	5383	NoV II	GII.P4	100	GII.4	100
II.4 EF128961	564	GII.P4	GII.4	4819	5383	NoV II	GII.P4	99	GII.4	100
II.5 AF397156	564	GII.P5	GII.5	4819	5383	NoV II	GII.P5	100	GII.5	100
II.5 AF414423	564	GII.P5	GII.5	4819	5383	NoV II	GII.P5	100	GII.5	100
II.6 AB039778	564	GII.P6	GII.6	4819	5383	NoV II	GII.P6	100	GII.6	100
II.6 JX989075	564	GII.P6	GII.6	4819	5383	NoV II	GII.P6	100	GII.6	100
II.7  II.6 KF434305	564	GII.P7	GII.6	4819	5383	NoV II	GII.P7	93	GII.6	100
II.7 AF414409	564	GII.P7	GII.7	4819	5383	NoV II	GII.P7	100	GII.7	100
II.7 AB258331	564	GII.P7	GII.7	4819	5383	NoV II	GII.P7	100	GII.7	100
II.8 AB039780	564	GII.P8	GII.8	4819	5383	NoV II	GII.P8	100	GII.8	100
II.8 AB067543	564	GII.P8	GII.8	4819	5383	NoV II	GII.P8	100	GII.8	100
II.11 AB126320	564	GII.P11	GII.11	4819	5383	NoV II	GII.P11	100	GII.11	100
II.11 AB074893	564	GII.P11	GII.11	4819	5383	NoV II	GII.P11	100	GII.11	100
II.13 EU921354	564	GII.P13	GII.13	4819	5383	NoV II	GII.P13	100	GII.13	100
II.13 AB447409	564	GII.P13	GII.13	4819	5383	NoV II	GII.P13	99	GII.13	100
II.18 AY823304	564	GII.P18	GII.18	4819	5383	NoV II	GII.P18	100	GII.18	100
II.18 AY823305	564	GII.P18	GII.18	4819	5383	NoV II	GII.P18	100	GII.18	100
II.22 GQ856469	564	GII.P22	GII.22	4819	5383	NoV II	GII.P22	100	GII.22	100
II.22 AB233471	564	GII.P22	GII.22	4819	5383	NoV II	GII.P22	100	GII.22	100

\*Genotyping through ORF1 and ORF2 regions is shown for all the strains used in this study. Uruguayan sequences are indicated in bold by their accession numbers.

**4.3 – Epidemiología y caracterización molecular de RVA detectados en niños hospitalizados por GAI en Salto, durante el período de dos años completos (2011-2012) (Artículo 3). (Vinculado a objetivo específico 3.2.3)**

Journal of Medical Virology 87:754–763 (2015)

**Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus Among Children Admitted to Hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012: First Detection of the Emerging Genotype G12**

Luis Fernando Lopez Tort,<sup>1</sup> Matías Victoria,<sup>1</sup> Andrés Lizasoain A,<sup>1</sup> Matías Castells,<sup>1</sup> Leticia Maya,<sup>1</sup> Mariela Martínez Gómez,<sup>2</sup> Edit Arreseigor,<sup>3</sup> Patricia López,<sup>4</sup> Juan Cristina,<sup>5</sup> Jose Paulo Gagliardi Leite,<sup>2</sup> and Rodney Colina<sup>1\*</sup>

**Objetivos:**

- Determinar la prevalencia de RVA en casos de niños hospitalizados por GAI en Salto, mediante la utilización de métodos moleculares (protocolos de “RT-PCR Multiplex Semi-anidadas” –“RT-PCR MSN”– para determinación de G- y P-tipos comunes en humanos), recomendados por la OMS para la caracterización molecular de este virus.
- Realizar la secuenciación parcial de los genes VP7 y VP4, para poder determinar mediante análisis filogenético los genotipos G y P comunes, emergentes e inusuales en humanos; así como también los linajes y sublinajes dentro de cada uno.
- Determinar la distribución por grupo etario y la estacionalidad de los RVA detectados.

**Revista:** *Journal of Medical Virology* (2015), 87: 754-763.

# Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus Among Children Admitted to Hospital in Salto, Uruguay, 2011–2012: First Detection of the Emerging Genotype G12

Luis Fernando López Tort,<sup>1</sup> Matías Victoria,<sup>1</sup> Andrés Lizasoain A,<sup>1</sup> Matías Castells,<sup>1</sup> Leticia Maya,<sup>1</sup> Mariela Martínez Gómez,<sup>2</sup> Edit Arreseigor,<sup>3</sup> Patricia Lopez,<sup>4</sup> Juan Cristina,<sup>5</sup> Jose Paulo Gagliardi Leite,<sup>2</sup> and Rodney Colina<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Virology Laboratory, North Regional, University of Republic, Salto, Uruguay

<sup>2</sup>Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Pediatric Unit, Medical-Surgical Society, Salto, Uruguay

<sup>4</sup>Pediatric Unit of Regional Public Hospital, Salto, Uruguay

<sup>5</sup>Molecular Virology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Republic, Montevideo, Uruguay

Group A rotavirus (RVA) is the most important etiologic agent of infant acute gastroenteritis (AGE) worldwide. Detection and molecular characterization of RVA in Salto department, Northwestern region of Uruguay, was conducted on 175 clinical samples, being 153 stool and 22 vomit samples, collected from hospitalized children with AGE, between 0–15 years old, from two hospitals of Salto city during 2011 and 2012. RVA was detected and genotyped by seminested multiplex RT-PCR in order to determine G- and P-genotypes. Positive samples were sequenced and phylogenetic analyses were carried out in order to determine lineages and sub-lineages. RVA were detected in 64 (37%) of the samples and the G and P genotypes observed were: 6% G1P[8], 23% G2P[4]/G2P[X]/GXP[4], 23% G3P[8]/G3P[X], 14% G12P[8]/G12P[X], 16% GXP[8], 1.5% G12P[9], 3% G2P[4]/[8], and 16% non-typeable. VP7 and VP4 genotypes related to *DS-1 like* gene constellation were prevalent during 2011 and those VP7 and VP4 genotypes related to *Wa-like* constellation were prevalent during 2012 (mainly represented by G3P[8]). Interestingly, RVA was detected in vomit samples in a high prevalence (41%). RVA was observed mainly in the age group between 1 and 5 years old (75% of the cases), and seasonality with a high detection rate in winter season was observed for the two consecutive years of surveillance. To our knowledge, this study represents the first detection and molecular characterization of RVA in Salto department, Northwestern region of Uruguay; and the first identification

of the emerging genotype G12 in the country.

**J. Med. Virol.** 87:754–763, 2015.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** group A rotavirus; hospitalized children; G- and P-genotypes; Salto; Uruguay

## INTRODUCTION

Group A rotavirus (RVA) is the most important cause of acute gastroenteritis in infants and young children in both developed and developing countries worldwide, accounting for 30–50% of this illness in the world and a high hospitalization and mortality rates in developing countries, particularly in Asia and sub-Sahara areas [Estes and Greenberg, 2013]. Although, actual universal mass vaccination against RVA has reduced mortality significantly, this virus still causes approximately a 192,700 deaths/year in children ≤5 years old [Walker et al., 2013].

Grant sponsor: Polo de Desarrollo Universitario (PDU); Grant sponsor: Universidad de la República (UdelaR), Uruguay; Grant sponsor: Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES, Brazil); Grant number: PCPP 023/2011; Grant sponsor: National Agency of Innovation and Investigation (ANII, Uruguay); Grant number: ANIIALI-2009-1-1603.

\*Correspondence to: Rodney Colina, PhD, Molecular Virology Laboratory, North Regional, University of Republic, Salto, Uruguay. E-mail: rodneycolina1@gmail.com

Accepted 11 November 2014

DOI 10.1002/jmv.24123

Published online 3 February 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

RVA belong to *Rotavirus* genus, *Reoviridae* family, and are non-enveloped dsRNA viruses with a segmented genome (11 gene segments). Based on the nucleotide sequence of their two outer capsid proteins genes, VP7 and VP4, RVA have been classified into G (Glycoprotein) and P (Protease-sensitive) genotypes, and, at present, 27 G and 37 P genotypes have been characterized [Estes and Greenberg, 2013; Trojnar et al., 2013]. Recently, a new rotavirus strain nomenclature has been proposed by the Rotavirus Classification Working Group [Matthijnssens et al., 2011].

RVA bearing the combinations G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], and G2P[8] are considered the most prevalent in humans worldwide, accounting for approximately 75% of cases globally [Bányai et al., 2012]; however, this picture has changed in the last decade and G12P[8] emerging genotype have been detected with high frequency in different countries, and it might become the sixth major human RVA G/P genotype combination [Rahman et al., 2007; Matthijnssens et al., 2010; Stupka et al., 2012; Gómez et al., 2014].

Following WHO/PAHO recommendation, Latin American countries introduced in their national immunization programs one of the licensed vaccines: RotaTeq<sup>®</sup> (RV5) (Merck and Co., Whitehouse Station, NJ) or Rotarix<sup>®</sup> (RV1) (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) [Ruiz-Palacios et al., 2006; Vesikari et al., 2006]. In the case of Uruguay, vaccination against RVA is not yet part of the national immunization program and both vaccines are available on the local market for consumers. These vaccines are mainly prescribed by private clinics, targeting a restricted population of children from medium- to high-income families. Molecular epidemiology of RVA is well documented in countries of South America, particularly in those neighboring Uruguay: Argentina, Brazil, and Paraguay [Parra, 2009; Carvalho-Costa et al., 2011; Linhares et al., 2011; Justino, 2014]. In Uruguay, only limited data has been generated due to lack of laboratory-based surveillance investigating the latest status of the RVA infections in the neonatal and infantile human population, and the available data were obtained exclusively from Montevideo population. The majority of those epidemiological data were published in local medical research journals [Pérez et al., 2011]. Actually, there are only three reports of RVA in Uruguayan population published in international indexed journal, also limited to patients from Montevideo, being only one of them with G genotypes characterized [Torres et al., 2001; De Sierra et al., 2002; Berois et al., 2003].

In order to gain insight into the molecular epidemiology, genetic variability and evolution of RVA in Uruguay, a 2 years (2011–2012) surveillance study were performed with the principal aim to investigate the viral prevalence, determine G and P genotypes, lineages and sub-lineages circulating in pediatric patients hospitalized in Salto, Northwestern region of Uruguay. To our knowledge, this study represents the first report of RVA in a country region other than

Montevideo, as well as the first description of G12 emerging genotype in Uruguayan population. In addition, it was possible for us to detect RVA in vomits in a high percentage of the cases.

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical Samples

A total of 175 clinical samples: 153 diarrheal fecal samples and 22 vomits samples, were collected from infants and young children (from 4 months to 15 years old), with acute gastroenteritis, hospitalized at the pediatric units of the Salto's public hospital and the Salto's private hospital "Medical-Surgical Society of Salto", between January 2011 and December 2012. Voluntary written informed consent was obtained from the parents or legal guardians at enrollment. Fecal and vomit samples were collected in sterile containers  $\leq 24$  hr after admission, and transported weekly at 4°C to the Laboratory of Molecular Virology of UDELAR-Salto. 10% of fecal suspensions or diluted vomits were prepared in phosphate buffered saline at pH 7.2 and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until processed.

### RNA Extraction, RVA Detection, and Genotyping by Semi-Nested Multiplex RT-PCR

RNA was extracted from fecal/vomit suspensions using QIAmp viral RNA mini kit (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The eluate (60  $\mu\text{l}$ ) was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until reverse transcription (RT) procedure.

To avoid cross-contamination, all procedures were performed in two different rooms (pre- and post-PCR amplification rooms). Samples and RNA extraction were manipulated and processed inside of NB2 aseptic cabinet with UV light decontamination. Positive and negative controls were included and maintained during all steps. The positive control was a culture supernatant containing RVA G1P[8] particles (Wa strain), and UltraPure<sup>®</sup> DNase/RNase-Free distilled water (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA) was used as a negative control.

Extracted RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScrip<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase and Random Hexamer Primers (both from Invitrogen<sup>™</sup>), according to the manufacturer's instructions. Then, the G and P genotyping procedures were carried out using the primers and Semi-Nested Multiplex PCR protocols as described by Das et al. [1994] and Gentsch et al. [1992], respectively, including modifications as recommended in the "Manual of rotavirus detection and characterization methods" [WHO, 2009], specially for our world region.

### Genotyping by DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis

All results obtained by Semi-Nested Multiplex RT-PCR for G and P genotyping, when possible, were confirmed subsequently by partial sequencing of the

VP7 (904bp) and VP4 (VP8\*) (876bp) genes amplicons obtained from the first round of amplification, using individually the pair of consensus primers: 9con1 or 9con2; 4con2 or 4con3, respectively. When the amplicons of the first round of amplification for VP7 and VP4 were not obtained, a second round of nested-PCR was performed using two internal consensus primers: VP7F/VP7Rdeg for VP7 gene (881bp) and VP4F/VP4R for VP4 gene (663bp), as previously described [WHO, 2009].

The G12 genotype determination was performed by using PCR protocols as previously described by Castello et al. [2006] and Aladin et al. [2010]. When possible, these results were confirmed by partial sequencing of the consensus PCR amplicons of VP7 gene, obtained as we previously described (904 bp or 881 bp amplicons).

Consensus PCR amplicons were purified by QIAquick PCR purification kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) and sequenced by using the dideoxy-nucleotide chain terminator method with the BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit on the automated sequencer ABI3130 Genetic Analyzer (both from Applied Biosystems®, Foster City, CA) by the DNA Sequencing Service of the Molecular Biology Unit at the Institute Pasteur of Montevideo. Sequencing reactions were carried out at least twice in each direction for each sample, to confirm that variations of nucleotide sequences were not due to sequencing errors.

Nucleotide sequences were edited and assembled by using the SeqMan program as implemented in the DNASTar v7.00 package (DNASTAR®, Madison, WI). The multiple sequence alignments and phylogenetic trees analysis were conducted using MEGA version 5 [Tamura et al., 2011]. The model of nucleotide substitution that best fit to each dataset, evaluated by the Akaike Information Criterion-AIC, was selected using jModelTest program [Posada, 2008]. AIC indicate that GTR+G+I fit the sequence data for both, VP7 and VP8\* aligned sequences. The phylogenetic relationships between strains were reconstructed by the Maximum Likelihood method. The statistical significance of the phylogenetic trees constructed was estimated by the bootstrap method (1,000 replicates). Prototype sequences obtained in studies of Uruguay's near countries used in the phylogenetic analyses were retrieved from GenBank database based on their close genetic relatedness with the strains sequenced in this study, by using Basic Local Alignment Tool (BLAST) server on the GenBank database. Prototypes G and P sequences of most common genotypes, lineages and sub-lineages in humans were also retrieved from GenBank and used in the phylogenetic analyses.

### Statistical Analysis

The statistical significance of the results were studied by the Department of Mathematics and Statistics (Universidad de la República, CENUR del

Noroeste, Regional Norte, Salto), by means of the use of the z-test for the difference in proportions between two independent binomial populations for large samples.

### Nucleotide Sequence Accession Numbers

Sequences obtained in the current study were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: KM056360-KM056393 (VP4 [VP8\*] gene) and KM068214-KM068246 (VP7 gene).

## RESULTS

RVA was detected in 64 (37%) out of 175 clinical samples collected (Table I). The age of the children infected with RVA ranged from 4 month to 15 years old, with 75% of the cases occurring in children between 1 and 5 years old; and also a higher diversity of genotypes were detected in this age span (Fig. 1). A higher RVA positivity rate in the age groups between 13 and 24 months (77%), and between 25 and 60 months (69%), was observed compared with the other age groups studied: 40% (0–6 months), 42% (7–12 months) and 24% (>5 years old) (Fig. 1). A statistically significant higher detection of RVA infections were observed in cold seasons (autumn and winter) compared with hot seasons (spring and summer) ( $p$  0,0048), and also in winter compared with autumn ( $p$  0,03), for the two consecutive years of surveillance covered by this study (Fig. 2).

From the total samples collected ( $n=175$ ), RVA was detected in nine (41%) of the 22 vomit samples and in 55 (36%) of the 153 fecal samples. Considering vomiting as main clinical symptom, 19 patients only presented vomit as main clinical symptom while 150 presented only Acute Diarrhea (AD). On the other hand, three patients have presented clinical symptoms of acute diarrhea and vomits at the same time and both type of samples were collected and analyzed for each patient. Two of them were positive for RVA and one of them have presented the genotype G2P[4] and G2P[X] in vomit and fecal sample, respectively; and the other patient was positive for G12P[X] (in vomit sample) and GXP[8] (in stool sample). In 32 samples (50% of the positive samples), the P and G genotype was successfully determined by Semi-Nested Multiplex RT-PCR and/or by phylogenetic analysis, and the RVA genotypes prevalence was as follow: 6% of G1P[8] (2/32), 31% of G2P[4] (10/32), 37,5% of G3P[8] (12/32), 16% of G12P[8] (5/32), 3% of G12P[9] (1/32), and 6% of G2P[4]/[8] (2/32). For the remaining 32 samples, only the P genotype was characterized in 11 (34,4%) of them: 31% of GXP[8] (10/32) and 3% of GXP[4] (1/32); only the G genotype in 11 of them (34,4%): 12,5% of G2P[X] (4/32), 9% of G3P[X] (3/32) and 12,5% of G12P[X] (4/32); and in the remaining 10 samples (31,2%), only the consensus DNA PCR fragments was obtained as a RVA diagnostic method, but in a very low concentration. Despite

TABLE I. Seasonal Distribution of G and P Genotype Combination of Group A Rotavirus Strain Detected From Hospitalized Children in Salto, Uruguay, During the Years 2011 and 2012

RVA genotype	Samples (n)							
	2011				2012			
	Summer	Autumn	Winter	Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring
G1P[8]		1						1
G3P[8]			1				11	
G12P[8]		2		1		1	1	
G3P[8] <sup>a</sup>		1					2	
G12P[X]	1				1	2		
GXP[8] <sup>b</sup>		3				2	5	
G2P[4]	2		8					
G2P[X]		2	1	1				
GXP[4]		1						
G2P[4]/[8]		1	1					
G12P[9]		1						
Non-typeable <sup>c</sup>				2	2	4	2	
Total (samples)	3	12		4	3	9	21	1

<sup>a</sup>P[X] = P-genotype could not be determined.

<sup>b</sup>G[X] = G-genotype could not be determined.

<sup>c</sup>Non-typeable = neither the P nor G genotype could not be determined.

several attempts, it was not possible to obtain nucleotide sequence of these samples (Table I).

During the first year of surveillance, VP7 and VP4 genotypes related to *DS-1 like* gene constellation were most frequently detected (61,5%) than VP7 and VP4 genotypes related to *Wa-like* gene constellation (38,5%) (p 0,05). Interestingly, during the second year of surveillance VP7 and VP4 genotypes related to *DS-1 like* gene constellation were not detected, and a higher detection of VP7 and VP4 genotypes related to *Wa-like* gene constellation was observed compared with 2011 (p 0,0003) (see Table I).

Sequencing analysis of VP7 and/or VP4 (VP8\*) partial gene was possible in 42 (66%) out of 64 positive samples. Thirty-three and thirty-four samples were efficiently sequenced for VP7 and VP4 (VP8\*) genes, respectively.

Phylogenetic analysis of the VP7 sequences obtained permitted us to observe that 13 strains belonged to the genotype G2, and all of them clustered inside lineage II (Fig. 3A, upper part). Only one strain was classified as genotype G1 and clustered inside lineage I (Fig. 3A, middle part). Six samples were confirmed to belong to the genotype G12, five of them assigned to lineage III while the other one was assigned to lineage II (Fig. 3A, middle part). Thirteen strains were classified as G3 genotype, all of them were clustered inside lineage III<sub>d</sub> (Fig. 3A, bottom part, and Supplemental Figure 1).

Phylogenetic analysis of VP4 (VP8\*) show us that 23 strains belonged to the genotype P[8], 19 clustered inside lineage III (P[8]-3) and the other four inside lineage I (P[8]-1) (Fig. 3B, upper part). From the 19 strains classified as P[8]-3, 18 clustered inside P[8]-3 sub-lineage 3 (P[8]-3.3), and the other one inside P[8]-3.1 (Supplemental Figure 2). Ten strains belonged

to the genotype P[4], all of them clustered inside lineage V (Fig. 3B, middle part), and one strain was classified as genotype P[9] and clustered inside lineage II (Fig. 3B, bottom part).

## DISCUSSION

Acute gastroenteritis is an important cause of morbidity and mortality in Uruguay [Ferrari et al., 2002]. In this study, the molecular epidemiology of RVA in sporadic cases of hospitalized children with acute gastroenteritis in Salto Department, Uruguay, was investigated for the first time. This study also represents the first report of RVA circulation in a population outside the capital of the country. A RVA prevalence of 37% was observed, which is in agreement with data described previously for Uruguay [Torres et al., 2001; Ramirez et al., 2001; Berois et al., 2003; Pérez et al., 2011; Linhares et al., 2011]. Seventy-five percentage of the cases occurred in children between 1 and 5 years old, which is also in agreement with global reports of RVA diseases affecting mainly children between 0 and 5 years old [Estes and Greenberg, 2013]. A higher RVA positivity rate in the two age groups: 13–24 months (77%) and 25–60 months (69%), was observed as compared with the other three age groups studied: 40% (0–6 months), 42% (7–12 months) and 24% (>5 years old). These results are in agreement with recent studies conducted in Brazil, where also a higher positivity in these two age groups was observed [Carvalho-Costa et al., 2011]. These results are also comparable with results obtained in all the Latin America and the Caribbean region [Linhares et al., 2011].

In this study, seasonality was observed with a RVA peak in winter, which has been also demonstrated in

*J. Med. Virol.* DOI 10.1002/jmv

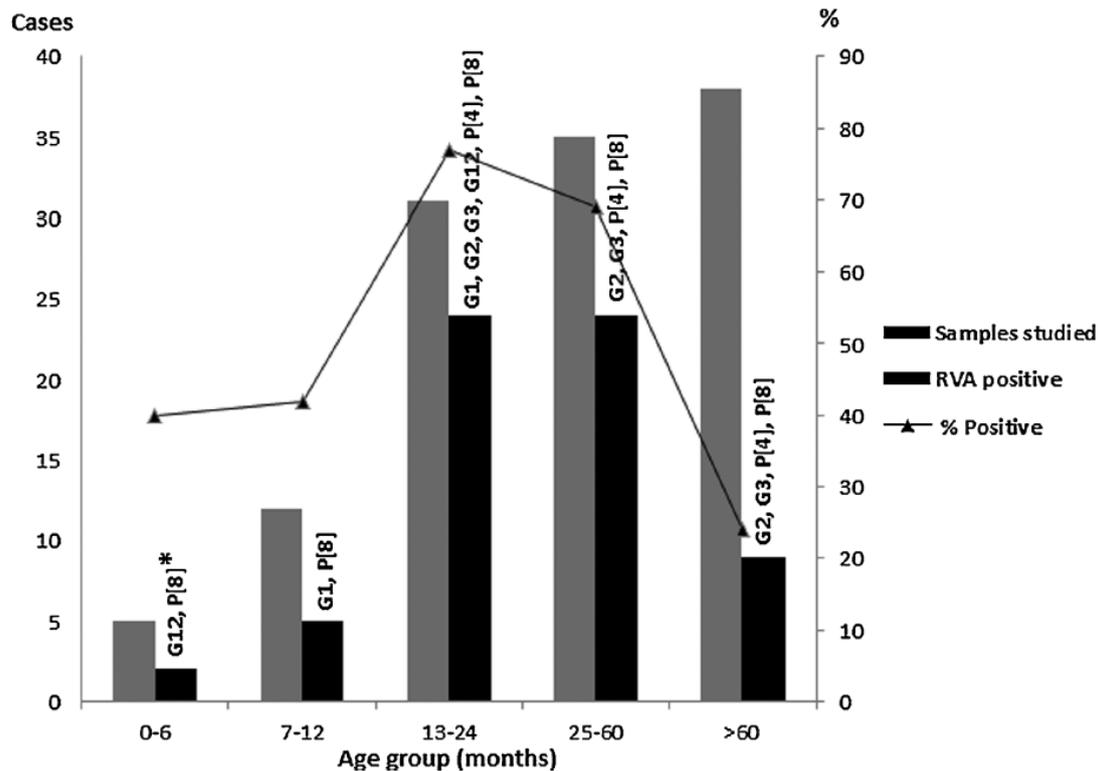


Fig. 1. Distribution by age groups of group A rotavirus (RVA) infections in hospitalized children in Salto, Uruguay, during 2 consecutive years (January 2011–December 2012). (\*RVA G and P genotypes detected in each age group).

the Latin America region for both temperate and tropical climate countries [Kane et al., 2004; Carvalho-Costa et al., 2011]. Uruguay has a temperate climate, and there are many studies showing that under these environmental conditions RVA disease can occur most often during the winter season [Cook et al., 1990; Estes and Greenberg, 2013; INUMET, 2014].

Of outstanding significance in the present study, was the detection of RVA in vomit samples of patients who presented vomiting as the only main symptom, and also the detection of the same RVA genotype in both vomit and stool samples of the same patient. To our knowledge, there are only two studies published in the literature in which RVA was detected in vomit samples previously [Cotterill et al., 1988; Youngs and Pugh, 1989]. Although the mechanism of RVA induction of vomiting has been recently discovered [Hagbom et al., 2011], recent studies have reported that aerosol generated with vomit is not a transmission path for rotavirus infection [Estes and Greenberg, 2013]. In contrast, work performed on Norovirus (NoV), a gastroenteric virus with a typical fecal-oral route of transmission that have been

reported to be second only to rotaviruses in causing severe childhood gastroenteritis globally [Glass et al., 2009], revealed that exposure to NoV in aerosolized vomitus particles resulted to be a source of NoV transmission in certain settings [Kirby et al., 2010, 2011; Green, 2013].

Recently, an increase detection rate of genotype G2P[4] was observed in Latin American region as a continental phenomenon; and in Brazil, a predominance of this genotype was observed early after the establishment of a national immunization program using the RV1 vaccine [Gurgel et al., 2007; Esteban, 2010; Martínez et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2011]. There are actually two theories, not mutually exclusive, proposed to explain the high prevalence of G2P[4] concomitant with RV1 introduction in some Latin American countries: i) RV1 introduction created selective conditions favoring the emergence of G2P[4] viruses (supported by the fact that this strain is fully heterotypic—doesn't share either the VP4, VP7 or any other VPs or NSPs genotypes specificity—with the RV1 strain, G1P[8]) [Matthijnssens and Van Ranst, 2012], ii) increased incidence of G2P[4] related to the common natural fluctuation observed

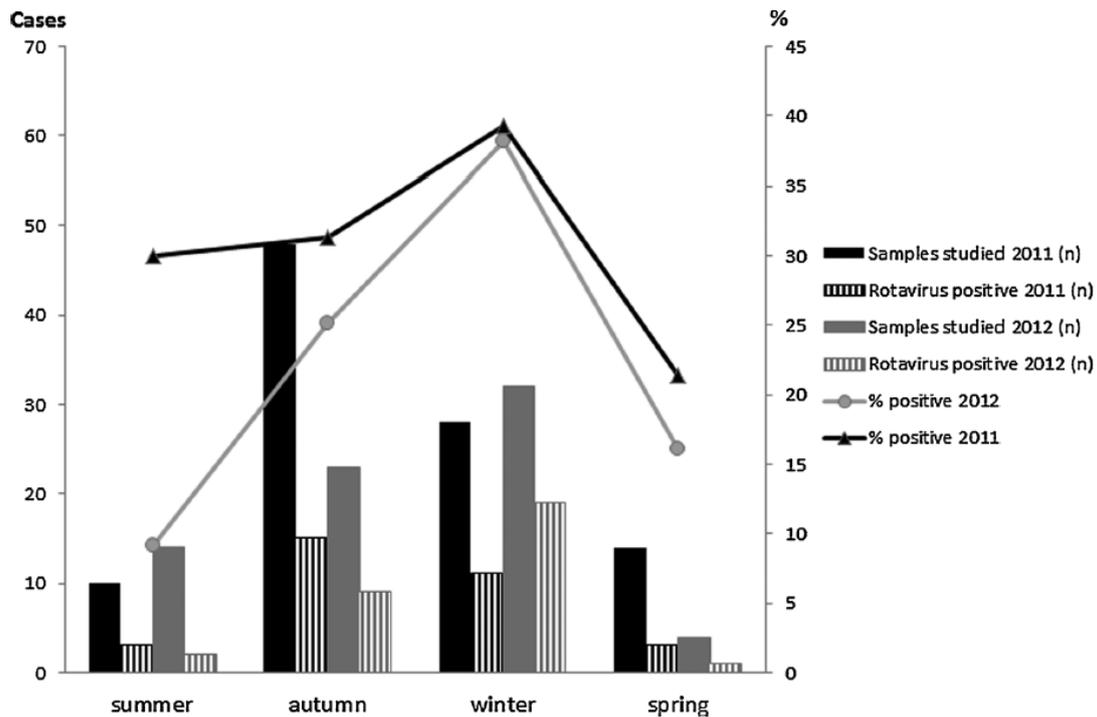


Fig. 2. Detection rates and seasonality of group A rotavirus (RVA) detection in cases of acute gastroenteritis in Salto, Uruguay, during 2 years (January 2011–December 2012). Uruguayan Seasons are as follow: Summer (January, February, and March), Autumn (April, May, and June), Winter (July, August, and September), and Spring (October, November, and December).

for RVA genotypes (supported by the fact of the concomitant prevalence of G2P[4] in Latin American countries where a National Immunization Program against RVA were not implemented, combined with the observation of a decreasing predominance of G2P[4] in Brazil since 2009 to more recent years) [Esteban, 2010; Martínez et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2011; F. A. Carvalho-Costa et al. unpublished data]. The results obtained in the present study are in accordance with the second proposed theory, since the VP4 and VP7 genotypes related to DS-1-like constellation that were predominant during the first year of surveillance, were not detected during the second year, in a country where RV1 has not yet been implemented in the National Immunization Program. Finally, the phylogenetic analysis showed that all the G2P[4] Uruguayan strains clustered together with the actual most commonly detected G2P[4] strains, that is, lineage II from the VP7 gene [Page et al., 2004] and lineage V from the VP4 (VP8\*) gene [Espinola et al., 2008].

The G3P[8] genotype is one of the five most common G/P combination detected globally [Bányai et al., 2012; Matthijssens et al., 2012]. Interestingly,

in a previous study, an increase in the prevalence of G3P[8]/G3P[X] in the Southern region of Brazil was detected in 2009, a region bordering Uruguay [Carvalho-Costa et al., 2011], and the same increase of G3P[8] since 2008, reaching more than a half of the samples characterized in 2009, was also observed in Argentina [Stupka et al., 2012], where the higher detection rate was observed in the central region of Argentina, a region also bordering Uruguay. This could be related with the predominance of G3P[8]/G3P[X] observed in this study during 2012, since a great number of tourists come to Uruguay in holiday from these neighbors countries. It is important to take into account that Salto city is a hotspot for tourism activity due to the presence of developed and attractive hot springs water parks [IMS, 2014]. In this sense, there are previous reports of recreational associated water-borne viral gastroenteritis outbreaks in hot spring parks [Sinclair et al., 2009]. All of the G3P[8] Uruguayan strains grouped together with the current commonly detected G3P[8] strain in Brazil [da Silva et al., 2013] and Argentina [Stupka et al., 2009], inside lineage III, sub-lineage d, from the VP7 gene [Thongprachum et al., 2013]; and lineage III,

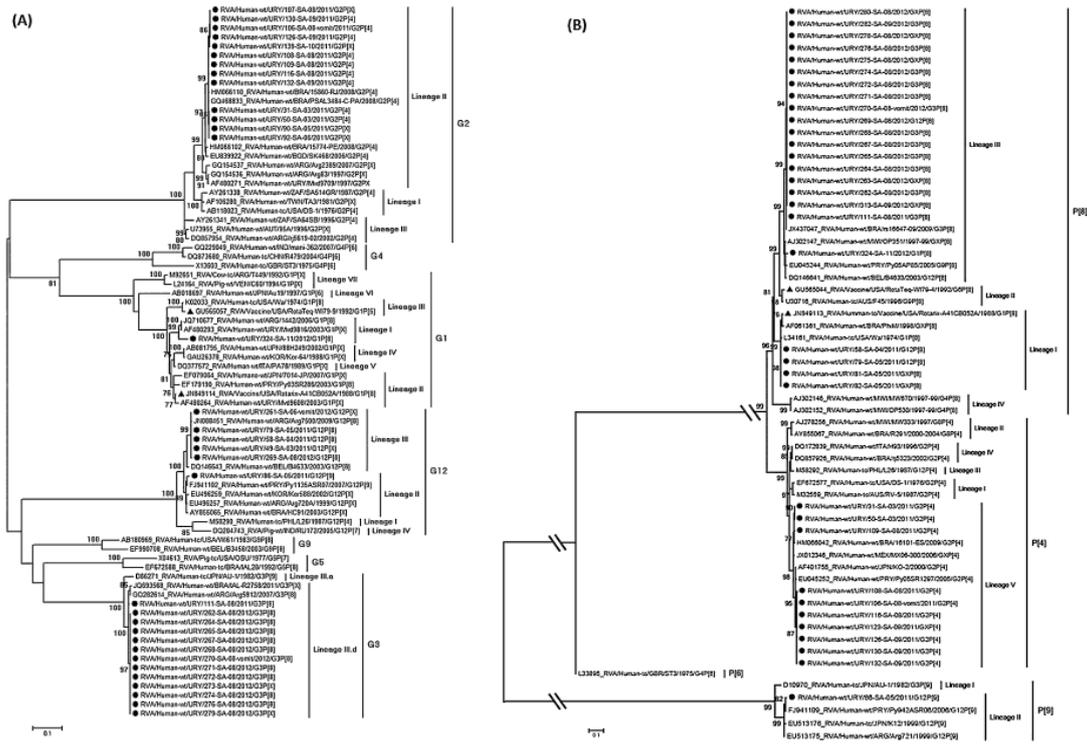


Fig. 3. Maximum likelihood phylogenetic tree analysis of VP7 and VP8\* partial gene nucleotide sequences of group A rotavirus (RVA) strains detected in hospitalized children from Salto, Uruguay. Strains in the trees are shown by name following the RV strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Prototype strains previously described are also shown by accession numbers. Numbers at the

nodes in the tree indicate Bootstrap values (only values above 70% are shown). The scale bar at the bottom represents substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Strains isolated in Salto are marked with a filled circle. Vaccine strains are marked with a filled triangle. In (A) the results obtained for VP7 gene is shown; the results found for VP8\* gene is shown in (B).

sub-lineage 3, from the VP4 (VP8\*) gene [Arista et al., 2006; da Silva et al., 2013].

In the present study, only two G1P[8] strains were detected, and from these, only one could be sequenced, that was classified as G1, lineage I [Arista et al., 2006], together with a previously detected G1 Uruguayan strain [Berois et al., 2003]. On the other hand, VP4 (VP8\*) gene phylogenetic analysis classified this strain as P[8], lineage III [Arista et al., 2006], sub-lineage 1 (P[8]-3.1) [da Silva et al., 2013]. G1P[8] is the most prevalent strain circulating in human worldwide since 1990's [Santos and Hoshino, 2005], however, the prevalence of G1P[8] strains declined from 2000 onward, although it remains still the most prevalent human RVA genotype [Bányai et al., 2012]. A similar picture was also observed for Latin America region [Linhares et al., 2011]. The result obtained in the present study are in accordance with the recent observation of a pronounced lowering in the prevalence of G1P[8] strain since

before 2006 in vaccinated (Brazil) and unvaccinated (Argentina and Paraguay) countries of Latin American region [Esteban et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2011].

One of the most interesting finding of this study was the high prevalence of the G12 as an emerging genotype, observed during the 2 years of the surveillance. Genotype G12 was first detected in children with diarrhea in the Philippines in 1987 and since the beginning of this millennium this genotype have emerged and spread in many countries worldwide [Rahman et al., 2007]. Four lineages inside G12 have been previously described [Rahman et al., 2007]. From these, the lineage III associated with P[8] have been recently determined to be the responsible of their global spread and it is expected to be the sixth most common RVA G/P combination found in human in the near future [Matthijssens et al., 2010]. From the six G12 positive samples obtained, five samples belonged to the major lineage III (three of them

associated with P[8]), and one sample belong to lineage II associated with P[9] genotype (lineage II) [Martinez et al., 2010]. In South America, G12P[9] was first detected in Buenos Aires in 1999 and more recently in Brazil and Paraguay [Castello et al., 2006; Martinez et al., 2010; Gómez et al., 2014]. On the other hand, G12P[8] was detected for the first time in South America in Argentina, in 2009 [Stupka et al., 2012], and more recently in Brazil [Gómez et al., 2014]. The detection of these two RVA genotype combination (G12P[9] and G12P[8]) globally is important for the vaccination programs against RVA being carried in all regions of the world, since G12 is not included in the formulation of the two most commonly used vaccines, RV1 and RV5 [Ruiz-Palacios et al., 2006; Vesikari et al., 2006].

A limitation of the present study was the high proportion of positive strains that were unable to be typed (Table I). This could be explained by: (i) the circulation of rotavirus strains with genotypes not included in the pool of primers; (ii) the accumulation of local point mutations in the primer binding sites of the VP4 and VP7 genes; (iii) low viral load in the samples; or (iv) RT-PCR inhibitors in the fecal and vomit samples [Santos et al., 2003; Iturriza-Gómara et al., 2004; Espinola, 2006]. Since an RNA extraction kit method was used to overcome the presence of PCR inhibitors during this study, the first three points discussed above seems to be the main causes of the presence of untypeable strains during this surveillance. Thus, further studies will need to be done to determine the genotypes from these samples. In an actual globally campaign of RVA vaccination and the WHO recommendation of the inclusion of RVA vaccination in the National Immunization Program of all countries worldwide [SAGE, 2009], molecular epidemiology studies are needed in countries where rotavirus vaccines have yet not been introduced, like Uruguay, in order to determine the disease burden attributable to severe RVA diarrhea in hospitalized children in different regions of the country and the genotype distribution inside these regions. RVA disease burden is estimated through surveillance networks and hospital registration systems to provide vital information regarding this pathogen in different countries. A close and good example of this is Brazil, where RV1 vaccine have been introduced in their National Immunization Program in March 2006, and the decision was supported by a significant amount of epidemiological data available from studies that showed the high burden of rotavirus disease in young children all over the country. These studies were based on a laboratory surveillance network of rotavirus severe diarrhea developed by Brazilian virologists since the early 1990's [Linhares and Justino, 2014]. In this sense, the present 2 year surveillance work done in Salto with acute gastroenteritis hospitalized children, constitute the first molecular epidemiology study of RVA in a Uruguayan region different to Montevideo.

Is also the first study describing G/P genotype combination of RVA strains circulating in Uruguay, as well as the first detection of the globally emerging G12 genotype in the country. In the same fashion, this work show the importance of performs RVA molecular epidemiology studies, in a country where no national surveillance program is developed for this virus. Finally, this study has generated epidemiological data that should be useful for the future implementation of RVA vaccination in the National Immunization Program.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mariana Garcia for her technical assistance, Marcelle Figueira Marques da Silva for provide the nucleotide sequence data set that was used in this study for the P[8]-3 sublineages phylogenetic analysis, and Federico Dalmao for his assistance in the statistical analysis. We also thank Dr. Marize Miagostovich for the critical reading of this manuscript and "Basic Sciences Post Graduate Program (PEDECIBA)" and their PhD Program, where Fernando López is student.

#### REFERENCES

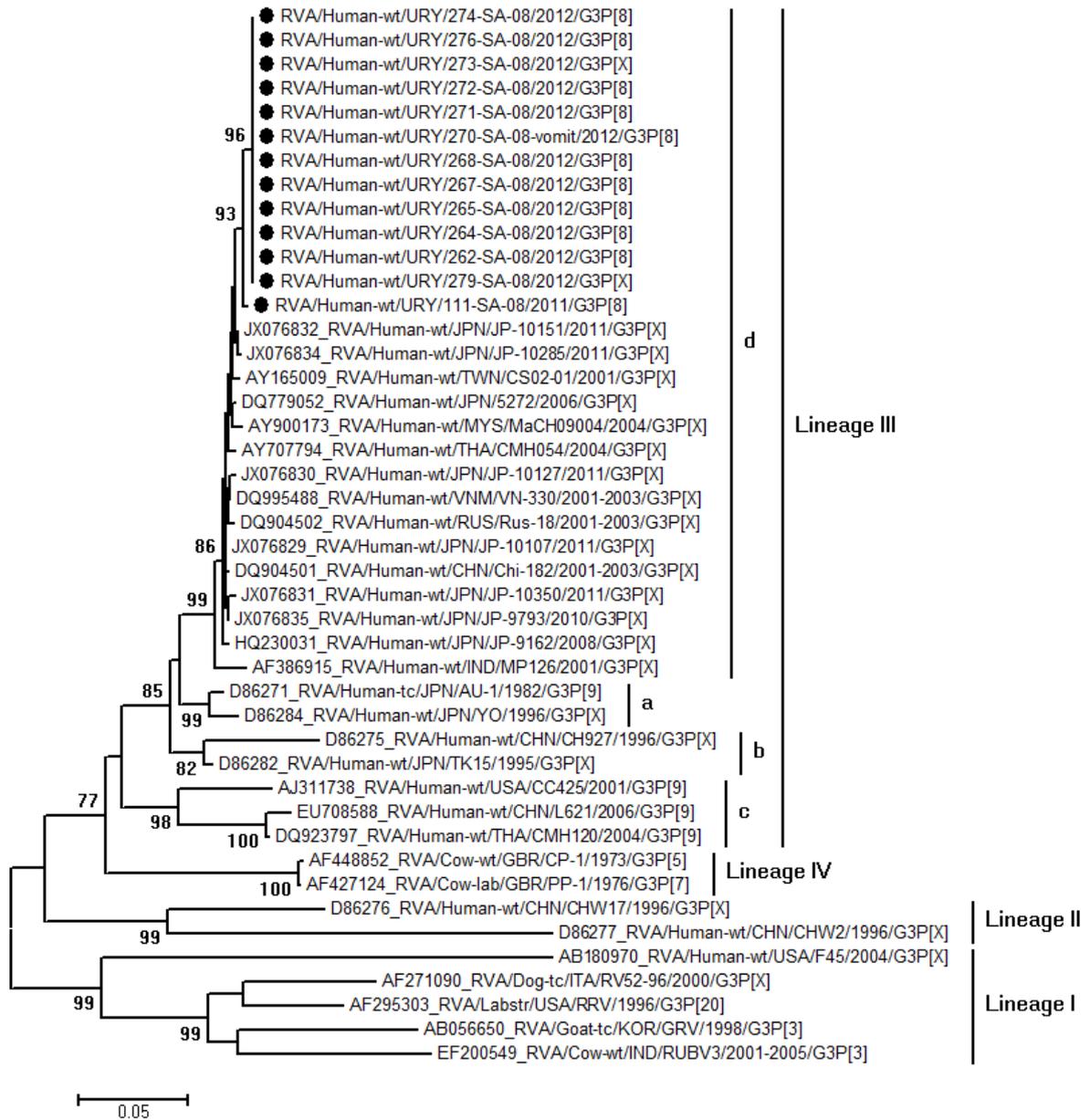
- Aladin F, Nawaz S, Iturriza-Gómara M, Gray J. 2010. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: Updating the current genotyping methods. *J Clin Virol* 47:340–344.
- Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, Cascio A, Martella V. 2006. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *J Virol* 80:10724–10733.
- Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR, Parashar UD. 2012. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine* 30:A122–A130.
- Berois M, Libersou S, Russi J, Arbiza J, Cohen J. 2003. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996–1999. *J Med Virol* 71:456–462.
- Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR. 1999. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine* 17:2207–2222.
- Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN, Tort LF, da Silva MF, Gómez MM, de Souza PM, Leite JP. 2011. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005–2009. *Pediatr Infect Dis J* 30:S35–S41.
- Castello AA, Argüelles MH, Rota RP, Olthoff A, Jiang B, Glass RI, Gentsch JR, Glikmann G. 2006. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol* 44:2046–2050.
- Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* 68:171–177.
- Cotterill H, Curry A, Riordan T. 1988. Rotavirus in vomit. *J Infect* 16:206–207.
- Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 32:1820–1822.
- De Sierra MJ, Sánchez AM, Quiricci L, Diamont A, Rodriguez G, Chiparelli H, Ferrari AM, Russi J, Arbiza J. 2002. Electropherotypes of rotaviral RNA from cases of infantile diarrhea in Uruguay. *Acta Virol* 46:103–106.

- Espínola EE, Amarilla A, Arbiza J, Parra GI. 2008. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *Arch Virol* 153:1067–1073.
- Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR, Jiang B, Esona M, Glass RI, Glikmann G, Castello AA. 2010. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004–2007. *J Med Virol* 82:1083–1093.
- Estes M, Greenberg H. 2013. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JL, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B, editors. *Fields virology*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Business, Lippincott Williams and Wilkins.
- Ferrari AM, Ferreira A, De Leonardi D, Fernández A, Imbricco J. 2002. Mortality in a pediatric hospital of national reference: “Pereira Rossell” Hospital. *Rev Med Urug* 18:59–65.
- Flores J, Perez-Schael I, Boeggeman E, White L, Perez M, Purcell R, Hoshino Y, Midthun K, Chanock RM, Kapikian AZ. 1985. Genetic relatedness among human rotaviruses. *J Med Virol* 17:135–143.
- Gómez MM, Resque HR, Volotão Ede M, Rose TL, Figueira Marques da Silva M, Heylen E, Zeller M, Matthijnsens J, Leite JP. 2014. Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. *Infect Genet Evol* 28:385–388.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1365–1373.
- Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Breese JS, Jiang B, Glass RI. 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: Implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 192:S146–S159.
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. 2009. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 361:1776–1785.
- Green KY. 2013. Caliciviridae: The noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JL, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B, editors. *Fields virology*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Business, Lippincott Williams and Wilkins.
- Greenberg HB, Wyatt RG, Kapikian AZ. 1979. Norwalk virus in vomitus. *Lancet* 1:55.
- Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC, Barros VC, Fontes PB, Salustino EF, Nakagomi O, Nakagomi T, Dove W, Cunliffe N, Hart CA. 2007. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population Brazil. *Emerg Infect Dis* 13:1571–1573.
- Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, Taylor JA, Loitto VM, Magnusson KE, Ahlman H, Lundgren O, Svensson L. 2011. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog* 7:e1002115.
- IMS (Municipality of Salto). 2014. Available from <http://www.salto.gub.uy/web/turismo-salto/turismo-termal> (accessed on July 15, 2014).
- INUMET (Uruguayan Institute of Meteorology). 2014. Documents about climate characteristics of Uruguay. Available from <http://meteorologia.gub.uy/index.php/caracteristicas-estacionales-del-clima> (accessed on June 16, 2014).
- Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. 2004. Rotavirus genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 31:259–265.
- Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Breese JS, Glass RI. 2004. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America: Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Publica* 16:371–377.
- Kirby A, Ashton L, Hart LJ. 2011. Detection of norovirus infection in the hospital setting using vomit samples. *J Clin Virol* 51:86–87.
- Kirby A, Dove W, Ashton L, Hopkins M, Cunliffe NA. 2010. Detection of norovirus in mouthwash samples from patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 48:285–287.
- Linhares AC, Justino MC. 2014. Rotavirus vaccination in Brazil: Effectiveness and health impact seven years post-introduction. *Expert Rev Vaccines* 13:43–57.
- Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK, Mazzoni A, Rodriguez JA, Rearte A, Lanzieri TM, Ortega-Barria E, Colindres R. 2011. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* 21:89–109.
- Martínez M, Amarilla AA, Galeano ME, Aquino VH, Farina N, Russomando G, Parra GI. 2010. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay 155:2006–2007.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijis I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82:3204–3219.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, John R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156:1397–1413.
- Matthijnsens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. 2010. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol* 27:2431–2436.
- Matthijnsens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M. 2012. Group A rotavirus universal mass vaccination: How and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes. *Expert Rev Vaccines* 11:1347–1354.
- Matthijnsens J, Van Ranst M. 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2:426–433.
- Nakagomi O, Ohshima A, Aboudy Y, Shif I, Mochizuki M, Nakagomi T, Gotlieb-Stematsky T. 1990. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J Clin Microbiol* 28:1198–1203.
- Pérez W, Decia M, Guzzo F, Montano A. 2011. Acute gastroenteritis in infants: Admission in the “Pereira Rossell” hospital in 82:2006–2007.
- Page NA, Steele AD. 2004. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from South Africa from 72:320–327.
- Parra GI. 2009. Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *J Med Virol* 81:568–571.
- Parra GI, Espínola EE. 2006. Nucleotide mismatches between the VP7 gene and the primer are associated with genotyping failure of a specific lineage from G12 rotavirus strains. *Virol J* 3:35.
- Posada D. 2008. JModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253–1256.
- Rahman M, Matthijnsens J, Yang X, Delbeke T, Arijis I, Taniguchi K, Iturriza-Gómara M, Iftekharuddin N, Azim T, Van Ranst M. 2007. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol* 81:2382–2390.
- Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, Salmerón J, Rüttimeann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckenoghe A, Clemens R, De Vos B, O’Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 354:11–22.
- SAGE. 2009. Meeting of the Immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009—conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec* 84:220–236.
- Santos N, Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15:29–56.
- Santos N, Volotao EM, Soares CC, Albuquerque MC, da Silva FM, Chizhikov V, Hoshino Y. 2003. VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. *Virus Res* 93:127–138.

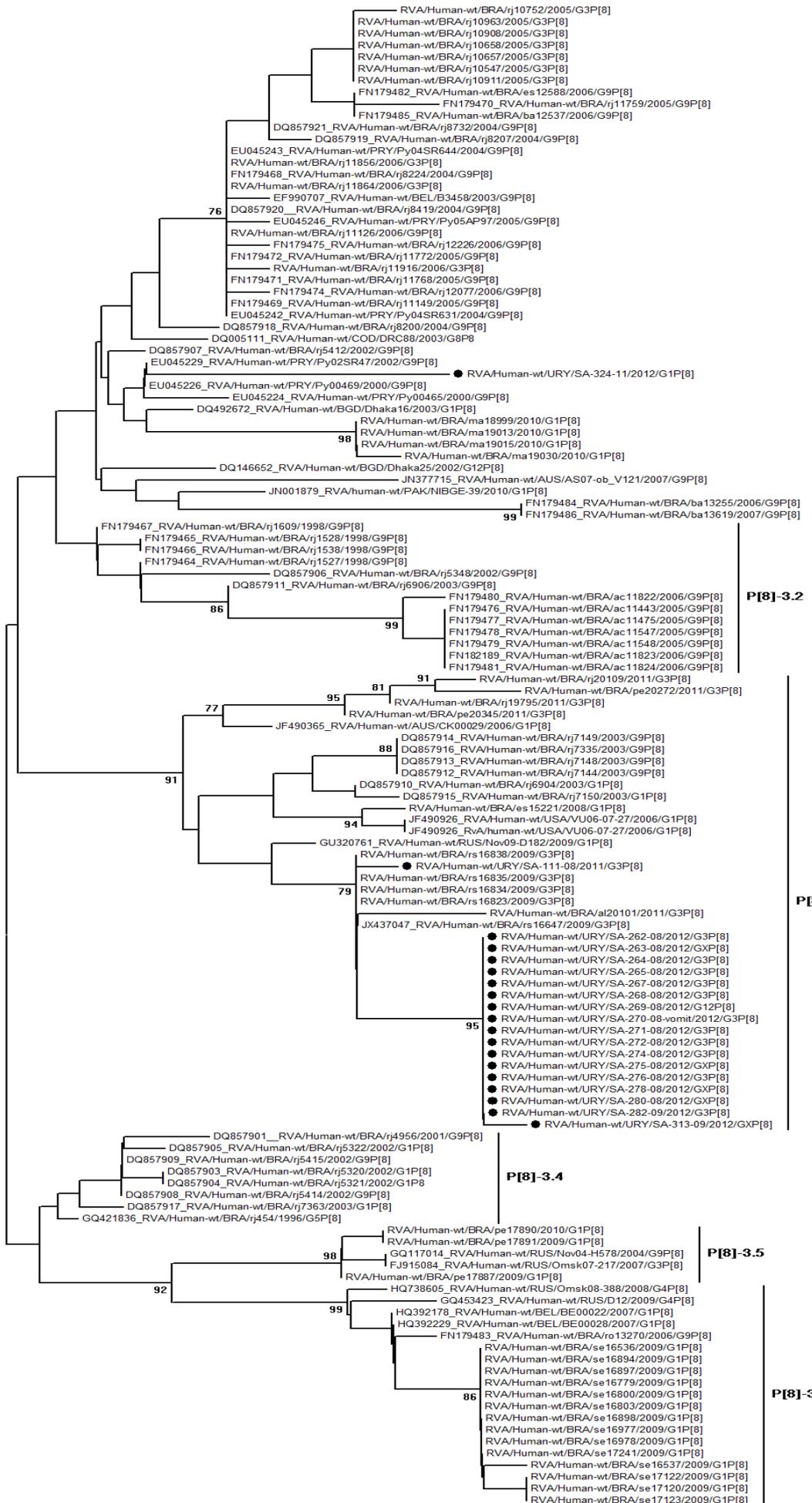
- Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. 2009. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *J Appl Microbiol* 107:1769–1780.
- Stupka JA, Degiuseppe JJ, Parra GI. 2012. Argentinean National Rotavirus Surveillance Network. 2012. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008–2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *J Clin Virol* 54:162–167.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Thongprachum A, Chan-it W, Khamrin P, Okitsu S, Nishimura S, Kikuta H, Yamamoto A, Sugita K, Baba T, Mizuguchi M, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. 2013. Reemergence of new variant G3 rotavirus in Japanese pediatric patients, 2009–2011. *Infect Genet Evol* 13:168–174.
- Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Méndez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. 2001. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol* 39:2134–2139.
- Trojaner E, Sachsenröder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R. 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol* 94:136–142.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, Dallas MJ, Heyse JF, Gouveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gotheffors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O'Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM; Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. 2006. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 354:23–33.
- WHO. 2009. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/08.17.
- Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, Black RE. 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 381:1405–1416.
- Youngs ER, Pugh SF. 1989. Rotavirus in vomit. *J Infect* 18:99.
- da Silva MF, Gómez MM, Rose TL, Volotão Ede M, Carvalho-Costa FA, Bello G, Leite JP. 2013. VP8\*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: Proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. *Infect Genet Evol* 16:200–205.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.



**Supplemental Figure 1.** Neighbor joining phylogenetic tree analysis of the G3 RVA strains detected in hospitalized children from Salto, Uruguay. The trees were constructed using the Kimura 2-parameters as a nucleotide substitution model. Numbers at the internal nodes indicate Bootstrap values, and only values above 75% are shown. The scale bar at the bottom represents substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Salto's strains are marked with a filled circle. GenBank nucleotide accession numbers of prototype strains are shown. RV strain nomenclature as proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG), was used.



P[8]-3.1

P[8]-3.2

P[8]-3.3

P[8]-3.4

P[8]-3.5

P[8]-3.6

0.005

**Supplemental Figure 2.** Neighbor joining phylogenetic tree analysis of the P[8]-3 RVA strains detected in hospitalized children from Salto, Uruguay. The trees were constructed using the Tamura-Nei model as a nucleotide substitution model. Numbers at the internal nodes indicate Bootstrap values, and only values above 75% are shown. The scale bar at the bottom represents substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Salto's strains are marked with a filled circle. GenBank nucleotide accession numbers of prototype strains are shown. RV strain nomenclature as proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG), was used.

**4.4 – Caracterización molecular, distribución geográfica y temporal de RVA en muestras ambientales de 6 ciudades localizadas al Noroeste y Este del país (Artículo 4). (Vinculado a objetivo específico 3.2.4)**

Food Environ Virol DOI 10.1007/s12560-015-9213-5	 CrossMark
ORIGINAL PAPER	
<b>Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay</b>	
Luis Fernando Lopez Tort <sup>1</sup> · Matías Victoria <sup>1</sup> · Andrés Lizasoain <sup>1</sup> · Mariana García <sup>1</sup> · Mabel Berois <sup>2</sup> · Juan Cristina <sup>3</sup> · José Paulo Gagliardi Leite <sup>4</sup> · Mariela Martínez Gómez <sup>4</sup> · Marize Pereira Miagostovich <sup>4</sup> · Rodney Colina <sup>1</sup>	

**Objetivos:**

- Determinar la frecuencia de RVA en aguas residuales de 6 ciudades localizadas al Noroeste y Este del país, mediante la utilización de protocolos de RT-PCR MSN para determinación de G- y P-tipos comunes en humanos.
- Realizar la secuenciación parcial de los genes VP7 y VP4, para poder determinar mediante análisis filogenético los genotipos G y P comunes, emergentes e inusuales en humanos; así como también los linajes y sublinajes dentro de cada uno.
- Comparar mediante análisis filogenéticos las cepas detectadas en este estudio, con cepas previamente detectadas en muestras clínicas de Uruguay.
- Determinar la distribución geográfica y temporal de los RVA detectados.

**Revista:** *Food and Environmental Virology* (2015), publicado “on-line”: 13 de Agosto.

## Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay

Luis Fernando Lopez Tort<sup>1</sup> · Matías Victoria<sup>1</sup> · Andrés Lizasoain<sup>1</sup> · Mariana García<sup>1</sup> · Mabel Berois<sup>2</sup> · Juan Cristina<sup>3</sup> · José Paulo Gagliardi Leite<sup>4</sup> · Mariela Martínez Gómez<sup>4</sup> · Marize Pereira Miagostovich<sup>4</sup> · Rodney Colina<sup>1</sup>

Received: 21 May 2015 / Accepted: 4 August 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Environmental approach has proven to be a useful tool for epidemiological studies demonstrating through environmental studies the diversity of viruses circulating in a given population. The aim of this study was to perform a phylogenetic characterization of the group A rotavirus (RVA) glycoprotein (G)- and protease-sensitive (P)-genotypes obtained from sewage samples ( $n = 116$ ) collected in six cities of Uruguay during March 2011 to April 2013. A worldwide standardized semi-nested multiplex RT-PCR (SNM RT-PCR) protocol directed against VP4 and VP7 genes were conducted for RVA detection and consensual DNA fragments were submitted to nucleotide sequencing. P and/or G genotype was successfully determined by phylogenetic analysis in 61 % ( $n = 37$ ) of the positive samples obtained by SNM RT-PCR ( $n = 61$ ). The RVA genotypes were as follow: G1 ( $n = 2$ ), G2 ( $n = 14$ ), G3 ( $n = 5$ ), G12 ( $n = 2$ ), P[4] ( $n = 4$ ), P[8] ( $n = 16$ ), and

P[3] ( $n = 2$ ). Interestingly, through phylogenetic analysis, emerging, and uncommon human genotypes could be detected. Results obtained from the comparison of RVA genotypes detected in the current study and Uruguayan RVA strains previously described for contemporary clinical pediatric cases showed that monitoring sewage may be a good screening option for a rapid and economical overview of the circulating genotypes in the surrounding human population and a useful approximation to study RVA epidemiology in a future vaccine monitoring program. The present study represents the first report in Uruguay that describes the phylogenetic diversity of RVA from urban sewage samples.

**Keywords** Group A rotavirus · G- and P-types · Phylogeny · Epidemiology · Sewage · Uruguay

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12560-015-9213-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rodney Colina  
rodneycolina1@gmail.com

- <sup>1</sup> Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Regional Norte – CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Gral. Rivera 1350, 50000 Salto, Uruguay
- <sup>2</sup> Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay
- <sup>3</sup> Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay
- <sup>4</sup> Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

### Introduction

Group A rotavirus (RVA) is the most important cause of acute gastroenteritis in infants and young children in both developed and developing countries worldwide, accounting for 30–50 % of these illnesses, with a high number of hospitalizations and mortality rates in developing countries (Estes and Greenberg 2013). Although, actual universal mass vaccination against RVA has reduced mortality significantly, this virus still causes 192,700 deaths/year in children  $\leq 5$  years old (Walker et al. 2013).

RVA belong to *Rotavirus* genus, *Reoviridae* family, and are non-enveloped dsRNA viruses with a segmented genome (11 gene segments). Based on the nucleotide sequence of their two outer capsid proteins genes, VP7 and VP4, RVA have been classified into glycoprotein (G)- and protease-sensitive (P)-genotypes, and, at present, 27 G- and 37

P-genotypes have been characterized (Estes and Greenberg 2013; Trojnar et al. 2013). In 2011 a new rotavirus strain nomenclature was proposed by the Rotavirus Classification Working Group (Matthijssens et al. 2011a). RVA bearing the combinations G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], and G2P[4] are considered the most prevalent in humans worldwide-common human genotypes, accounting for approximately 75 % of cases globally (Bányai et al. 2012); however, this picture has changed in the last decade and G12P[8] emerging genotype has been detected with high frequencies in different countries, and it might become the sixth major human RVA G/P genotype combination (Matthijssens et al. 2010; Stupka et al. 2012; Gómez et al. 2014b).

Following WHO/PAHO recommendation, Latin American countries introduced in their national immunization programs one of the licensed vaccines: RotaTeq<sup>®</sup> (RV5) (Merck and Co. Whitehouse Station, NJ, USA) or Rotarix<sup>®</sup> (RV1) (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) (Ruiz-Palacios et al. 2006; Vesikari et al. 2006). In the case of Uruguay, vaccination against RVA is not yet part of the National Immunization Program (NIP) and both vaccines are available on the local market.

RVA are excreted in extremely high concentrations in feces (up to  $10^{11}$  virus/g), have a low infectious dose and its molecular structure makes them stable in aqueous environments for long periods of time and very resistant to adverse environmental condition (Graham et al. 1987; Espinosa et al. 2008). RVA have been detected in sewage since 80's (Steinmann 1981), and have been associated with waterborne gastroenteritis outbreaks (Hopkins et al. 1984; Villena et al. 2003).

Environmental surveillance by using molecular techniques for detecting and characterizing RVA from sewage samples is a useful strategy to get a deeper knowledge of the RVA genetic diversity circulating in a given community, once viruses detected might reflect the infectious status of the population. Urban sewage contains RVA excreted by hospitalized children between 0 and 5 years old, the age group mostly affected by this virus, but also includes RVA from infected individuals belonging to all of the age groups of the community (whether they are symptomatic or asymptomatic) and from animals with zoonotic potential-uncommon genotypes in human (Metcalf et al. 1995; Bosch et al. 2008).

Nowadays, there are environmental surveillance studies of RVA that describe the G- and P-types in sewage by using the semi-nested multiplex RT-PCR (SNM RT-PCR) method universally applied for clinical surveillance (Rodríguez-Díaz et al. 2009; Fumian et al. 2011; Prado and Miagostovich 2014), however, to our best knowledge, at present only one recently published study describes the

G- and P-types from sewage through nucleotide sequencing and phylogenetic analysis (Ruggeri et al. 2015).

In Uruguay, only one study was recently performed regarding the RT-PCR detection and quantification of RVA in sewage samples obtained in the Northwestern region of the country (Victoria et al. 2014).

In this study, we conduct a RVA phylogenetic analysis, with strains obtained from sewage samples, in order to demonstrate the genetic diversity and the temporary/geographic distribution of the RVA genotypes (G- and P-types) in six cities of Uruguay. With that purpose, RVA strains detected from sewage samples were sequenced and compared with clinical ones obtained at the same period from hospitalized children with acute gastroenteritis in Uruguay (Tort et al. 2015).

## Materials and Methods

### Sewage Sample Collection and Strategy of the Study

The area of this study was demarked in six cities located in the Northwestern (border with Argentina) and Eastern (border with Brazil) regions of Uruguay (Fig. 1). The six cities are the capital and the most populated city of the six Uruguayan Departments to which they belong (I.N.E. 2011). One sampling collection site was determined in each of the cities studied. Two sets of sewage samples were collected, the set one from the Eastern region included 20 untreated sewage samples collected with a periodicity of one sample every 2 months in each city from September, 2011 to April, 2013. The sewage samples set two from the Northwestern region, included 47 RVA positive samples previously genotyped by using SNM RT-PCR methodology from 96 samples collected bi-monthly in each city from March, 2011 to February, 2012 (Victoria et al. 2014).

### Virus Concentration, RNA Extraction and cDNA Synthesis

Sewage samples were concentrated by using ultracentrifugation methodology as described by Pina et al. (1998) with modifications added by Fumian et al. (2010) and inoculated with 500  $\mu$ L of bacteriophage PP7 as an internal process control before the concentration assay (Rajal et al. 2007).

Nucleic acids were extracted from 140  $\mu$ L of the viral concentrate obtained after the ultracentrifugation methodology, by using *QIAmp viral RNA mini kit* (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScrip<sup>®</sup> II reverse transcriptase and random



**Fig. 1** Map of collection sites (black circles with white numbers) located in six cities along Eastern (1 and 2) and Northwestern (3 to 6) regions of Uruguay: Melo—Cerro Largo Department (1), Treinta y Tres—Treinta y Tres Department (2), Bella Unión—Artigas Department (3), Salto—Salto Department (4), Paysandú—Paysandú Department (5),

and Fray Bentos—Río Negro Department (6). GPS of collection site in each city are as follow: 32°22'30.6"S 54°10'35.7"W (1), 33°14'19.7"S 54°23'31.5"W (2), 30°15'59.55"S, 57°36'4.79"W (3), 31°23'18.82"S, 57°58'35.09"W (4), 32°19'38.38"S, 58°6'3.83"W (5), and 33°7'8.95"S, 58°20'3.38"W (6)

hexamer primers (both from Invitrogen™, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions.

#### Molecular Characterization of Group A Rotavirus

The RVA G- and P-genotyping procedures were carried out using the primers and SNM RT-PCR protocols described by Das et al. (1994) and Gentsch et al. (1992), respectively, including modifications as recommended in the manual of rotavirus detection and characterization methods (WHO 2009), for our world region (Online Resource 1).

All RVA positive samples obtained by SNM RT-PCR for G- and P-genotyping from both sets, were submitted to a partial nucleotide sequencing of the VP7 (904 bp) and VP4 (VP8\*) (876 bp) genes amplicons obtained from the first round of amplification, using individually the pair of consensus primers: 9con1 or 9con2; 4con2 or 4con3, respectively. When the amplicons of the first round of amplification for VP7 and VP4 were not obtained, a second round of Nested-PCR was performed using two internal consensus primers: VP7F/VP7Rdeg for VP7 gene (881 bp) and VP4F/VP4R for VP4 gene (663 bp), as previously described (Online Resource 1) (Gómara et al. 2001; Simmonds et al. 2008; WHO 2009).

Consensus PCR amplicons were purified by QIAquick PCR purification kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) and sequenced by using the dideoxy-nucleotide chain terminator method with the BigDye® terminator cycle sequencing kit on the automated sequencer ABI3130 genetic analyzer

(both from Applied Biosystems®, Foster City, USA) by the DNA Sequencing Service of the Molecular Biology Unit at the Institute Pasteur of Montevideo. Sequencing reactions were carried out at least twice in each direction, for each sample, to confirm the consistency of the sequencing result and ensure that variations of nucleotide sequences were not due to sequencing errors.

Nucleotide sequences were edited and assembled by using the SeqMan program as implemented in the DNASTar v7.00 package (DNASTAR®, Madison, USA). The multiple sequence alignments and phylogenetic trees analysis were conducted using MEGA version 5 (Tamura et al. 2011). The model of nucleotide substitution that best fit to each dataset, evaluated by the Akaike information criterion (AIC), was selected using jModelTest program (Posada 2008). AIC indicate that GTR+G+I fit the sequence data for both, VP7 and VP8\* aligned sequences. The phylogenetic relationships between strains were reconstructed by the maximum likelihood method. The statistical significance of the phylogenetic trees constructed was estimated by the bootstrap method (1000 replicates). VP7 and VP8\* RVA nucleotide sequences obtained from contemporary clinical samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Salto city, Uruguay (Tort et al. 2015), were included in the sequence data set of this study for a comparative analysis between virus circulating in clinical and environmental samples. Prototype sequences obtained in studies of Uruguay's near countries used in the phylogenetic analyses were retrieved from GenBank database

based on their close genetic relatedness with the strains sequenced in this study, by using basic local alignment tool (BLAST) server on the GenBank database. Prototypes G and P sequences of most common genotypes, lineages and sub-lineages in humans were also retrieved from GenBank and used in the phylogenetic analyses.

### Nucleotide Sequence Accession Numbers

Sequences obtained in the current study were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: KP271247–KP271269 (VP7 gene) and KP271270–KP271291 (VP4 [VP8\*] gene).

## Results

### Molecular Characterization of Rotavirus Strains

Table 1 presents RVA detection and characterization by SNM RT-PCR and phylogenetic analysis from two sets of sampling. A high RVA genetic diversity was observed in the sewage of both studied regions, with different G- and P-types detected. The SNM RT-PCR results were confirmed

by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis, in which the same G- and P-types were determined by both methodologies. The exceptions were the G12 and P[3] strains, for which there isn't genotype specific primers in the cocktail of primers used in the Multiplex, and therefore they were detected only by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis methodology.

Twenty-four out of 47 positive samples (51 %) from the Northwestern region, were effectively sequenced and analyzed for VP7 and/or VP4 (VP8\*) partial genes. In the same fashion, 13 out of 14 positive samples (93 %) from the Eastern region were effectively sequenced and analyzed for both, VP7 and/or VP4 (VP8\*) partial genes. It was possible to determine the circulation of globally common (G1, G2, P[4] and P[8]) emerging (G12) and uncommon or "rare" (P[3] and G3-lineage I) human genotypes (Table 1; and Online Resource 2).

The P and/or G genotype was successfully determined by phylogenetic analysis in 61 % ( $n = 37$ ) of the positive samples obtained by SNM RT-PCR ( $n = 61$ ). The nucleotide sequence was obtained from 23 to 22 samples, for VP7 and VP4 (VP8\*) genes, respectively, and the RVA genotypes were as follow: G1 ( $n = 2$ ), G2 ( $n = 14$ ), G3 ( $n = 5$ ), G12 ( $n = 2$ ), P[4] ( $n = 4$ ), P[8] ( $n = 16$ ) and P[3] ( $n = 2$ ) (Table 1; and Online Resource 2).

**Table 1** Detection rate by semi-nested multiplex RT-PCR and sequence analysis result of group A rotavirus (RVA) according to collection sites

Country region	City ( $n^a$ )/population <sup>b</sup>	RVA RT-PCR/sequence analysis result				
		Multiplex <sup>c</sup> pos/stud ( $n$ ) (%)	VP4 <sup>d</sup> pos/stud ( $n$ )	P-types	VP7 <sup>e</sup> pos/stud ( $n$ )	G-types
East	Melo (1)/51,830	7/10 (70)	4/7	P[8]	4/7	G1, G2, G3, G12
	Treinta y Tres (2)/25,477	7/10 (70)	5/7	P[3], P[4], P[8]	3/7	G2, G3, G12
Northwest	Bella Unión (3)/12,200	11/24 (46)	2/11	P[8]	2/11	G2
	Salto (4)/104,028	13/24 (54)	8/13	P[3], P[8], P[4]	7/13	G2, G3
	Paysandú (5)/76,429	14/24 (58)	2/14	P[4], P[8]	7/14	G1, G2, G3
	Fray Bentos (6)/24,406	9/24 (38)	1/9	P[8]	4/9	G2, G3

*pos* positive, *stud* studied

<sup>a</sup> The number between brackets corresponds with the assigned number to the collection point in each of the six city marked in the Uruguay map of Fig. 1

<sup>b</sup> Number of inhabitant of each city according with the last Uruguayan national census made in 2011 (I.N.E. 2011)

<sup>c</sup> Semi-nested multiplex RT-PCR result. Samples were considered positive when G- and/or P-genotype could be determined accordingly with protocols previously described (Das et al. 1994; Gentsch et al. 1992; WHO 2009). The semi-nested multiplex RT-PCR result of the cities located at the Northwest region (Bella Unión, Salto, Paysandú and Fray Bentos) have been published previously (Victoria et al. 2014)

<sup>d</sup> Sequence analysis result of VP4 gene. *pos* positive samples determined by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of VP4 gene amplicon obtained after a nested RT-PCR protocol by using the consensual primers: 4con2/4con3 in the first round of amplification, followed by a second round of amplification using the consensual primers: VP4F/VP4R, as previously described (WHO 2009). *stud*: positive samples determined by semi-nested multiplex RT-PCR analysis

<sup>e</sup> Sequence analysis result of VP7 gene. *pos* positive samples determined by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of VP7 gene amplicon obtained after a nested RT-PCR protocol by using the consensual primers: 9con1/9con2 in the first round of amplification, followed by a second round of amplification using the consensual primers: VP7F/VP7Rdeg, as previously described (WHO 2009). *stud*: positive samples determined by semi-nested multiplex RT-PCR analysis

### Geographical Distribution of Rotavirus Genotypes

Differences in the geographical distribution of the G- and P-types detected were observed in Northwestern and Eastern regions. In the Northwestern region a prevalence of VP7 and VP4 genotypes commonly related to DS-1 like gene constellation was observed, while in the Eastern region a prevalence of VP7 and VP4 genotypes commonly related to Wa-like gene constellation was observed in the two cities analyzed. Globally common G- and P-types were detected in both regions, as well as the uncommon P[3] genotype; however, the emerging G12 genotype was detected only in the Eastern region and in both cities studied (Table 1; and Online Resource 3).

### Temporal Distribution of Rotavirus Genotypes

Differences in the temporal distribution of RVA were observed in Northwestern and Eastern regions. A pattern of seasonality was observed in the Northwestern region with a RVA detection peak in winter (Fig. 2a, left side). However, no pattern of seasonality was observed in the Eastern region (Fig. 2b, left side). In the RVA detection peak observed in winter for the Northwestern region, a prevalence of VP7 and VP4 genotypes commonly related to DS-1 like gene constellation was observed (Fig. 2a, right side). The VP7 and VP4 genotypes commonly related to DS-1 like gene constellation were observed in 2011, and were not detected in 2012 and 2013. On the other hand, VP7 and VP4 genotypes commonly related to Wa-like gene constellation were detected during the 3 years of the study (2011–2013) (Fig. 2a, b, right sides).

### Phylogenetic Analysis of Rotavirus G-Types

For explanatory purposes, when two or more Uruguayan strains shared 100 % of nucleotide (nt) identity, one of them was chosen as representative strain of the group in the tree. In this sense, the strain A35 of genotype G2 is representative of the strains A47, A55 and A63; the strain A64 of genotype G2 is representative of the strains A42, A48, and A62; the strain A69 of genotype G2 shared 100 % of nt identity with the strain A57, and was chosen as representative of the two strains; and finally, the strain A84 of genotype G3 shared 100 % of nt identity with the strain A67, and was chosen as representative of the two strains (see Online Resource 2 for more information about the Uruguayan strains).

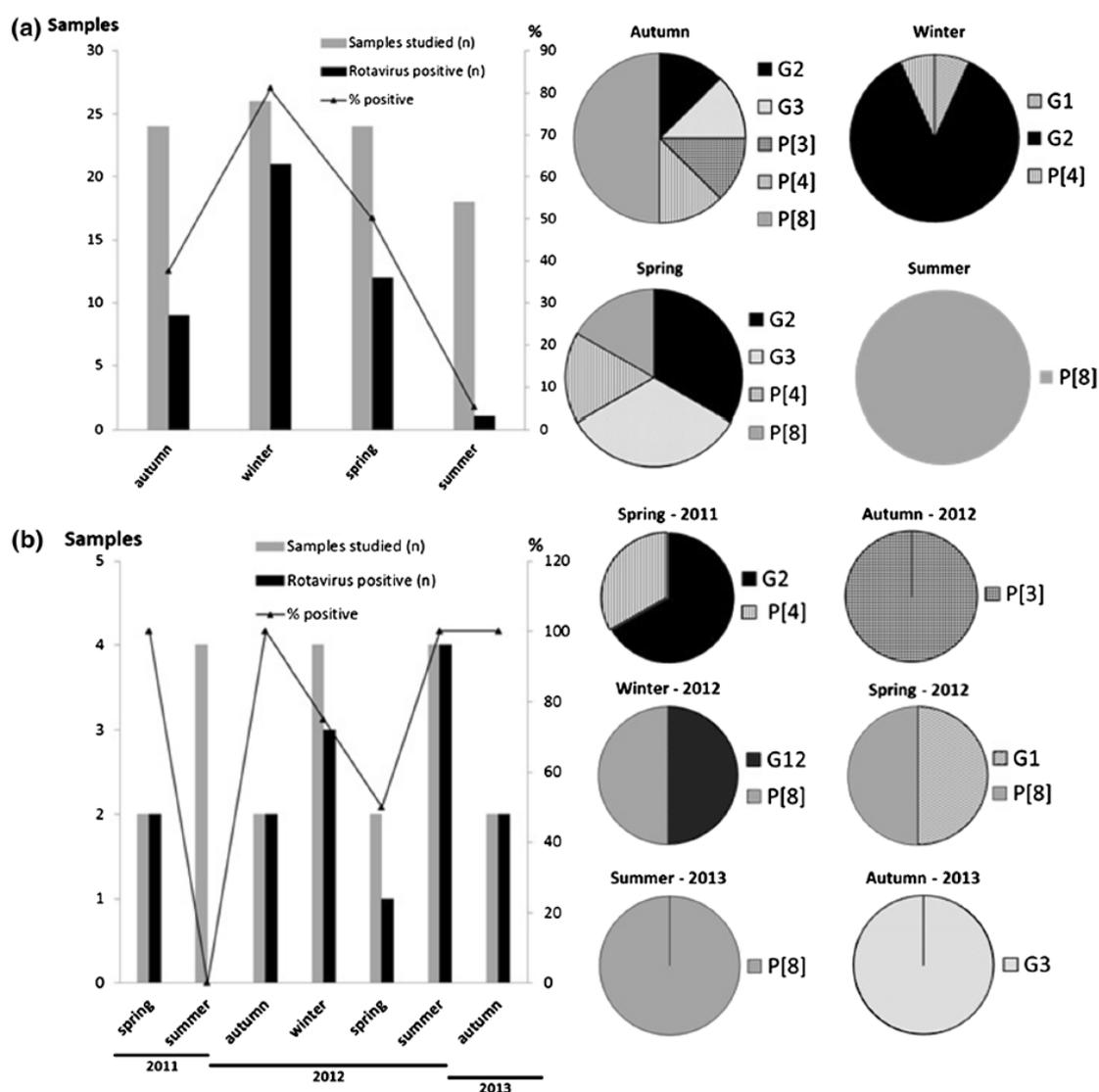
VP7 phylogenetic analysis showed that fourteen environmental strains belonged to the genotype G2, twelve of them were detected in the Northwestern region and the remaining two in the Eastern region. All the G2 strains were detected in 2011 and are clustered within lineage II, along

with G2P[4] strains from clinical samples of Uruguay (Salto city), Brazil and Argentina, collected during the same period (Fig. 3a, bottom part). Only two strains samples were classified as genotype G1, one of them was detected in the Northwestern region in 2011 and the other one in the Eastern region in 2012. Both G1 strains clustered within lineage I, along with a G1P[8] strain from a clinical sample of a hospitalized child with acute gastroenteritis in Salto city, Uruguay, during 2011. This clinical strain cluster together with the environmental strain from Eastern region with a high Bootstrap value support (99 %) (Fig. 3a, middle part). Two samples were confirmed to belong to the emerging genotype G12, both detected in the Eastern region in 2012, one of them was detected in Melo city and the other one was detected in Treinta y Tres city. One of this G12 detected in Melo was assigned to lineage III, and clustered together with a G12P[8] strain obtained from a clinical sample of a hospitalized child with acute gastroenteritis in Salto city during 2011. The other one (from Treinta y Tres) was assigned to lineage II and clustered together with a G12P[9] strain from a clinical sample of a hospitalized child with acute gastroenteritis in Salto city during 2011 (Fig. 3a, middle part). Five strains were classified as G3 genotype, three of them were detected in the Northwestern region in 2011, and the other two were detected in the Eastern region in 2013. All of the G3 strains of this study grouped together in a cluster that only contain G3P[3] strain of human and animal origin, and were assigned to lineage I. These G3 strains were phylogenetically distant from the globally common G3 strain which formed another cluster with the human G3P[8] prototype strains together with G3P[8] strains obtained from clinical samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Salto city in 2011–2012 (lineage IIIId) (Fig. 3a, upper part; Online Resource 4).

### Phylogenetic Analysis of Rotavirus P-Types

In the same way as for the phylogenetic analysis of VP7, in the VP4 phylogenetic tree: the strain A140 of genotype P[8]-lineage 3 is representative of the strains A145, A148, and A157; the strains A28 of genotype P[8]-1 is representative of the strains A5, A7, A8, A11, A13, and A21; and finally, the strain A57 of genotype P[4] shared 100 % of nt identity with the strain A69, and was chosen as representative of the two strains (see Online Resource 2 for more information about the Uruguayan strains).

Phylogenetic analysis of VP4 (VP8\*) showed that sixteen strains belonged to the genotype P[8], nine clustered within lineage III (P[8]-3) together with a G1P[8] strain from a clinical sample of a hospitalized child with acute gastroenteritis in Salto city during 2012, and the other seven inside lineage I (P[8]-1) together with a G12P[8]



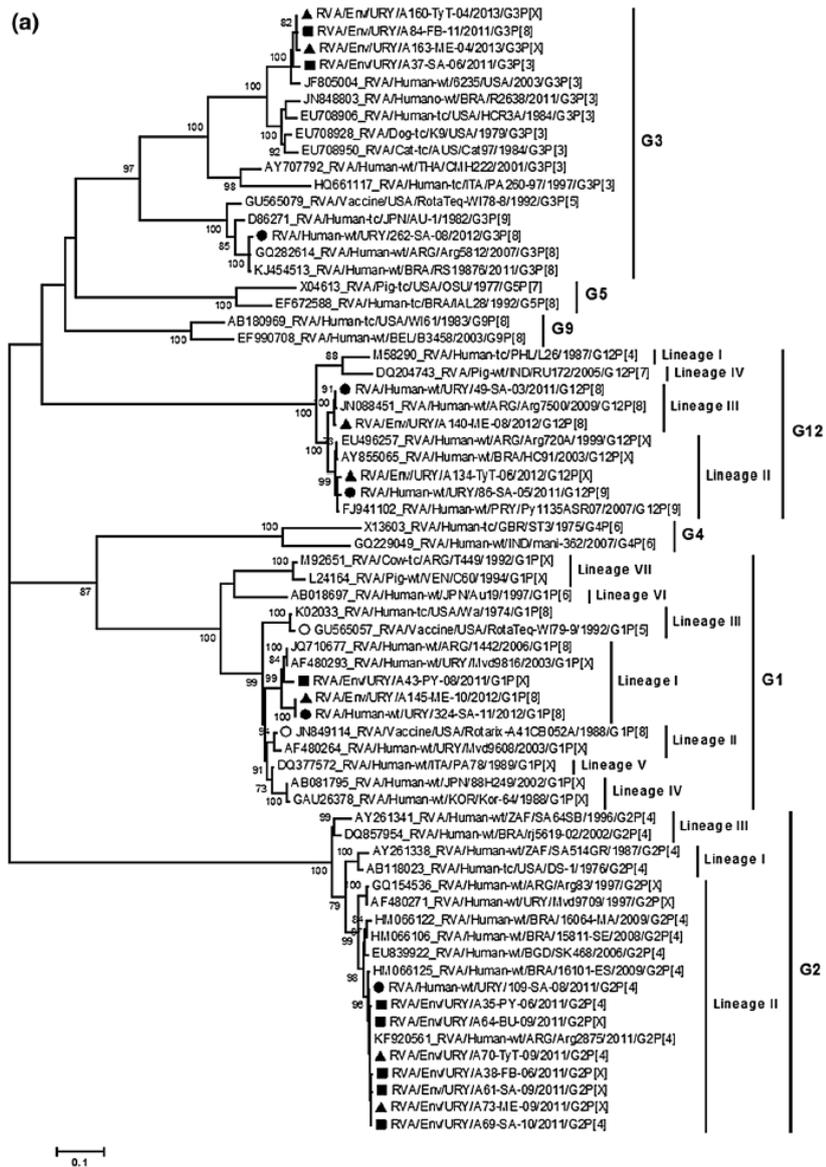
**Fig. 2** Detection rates and distribution of group A rotavirus (RVA) detected in sewage of six cities located in the Northwestern (a) and Eastern (b) regions of Uruguay, 2011–2013, according to the Season of collection. **a** *Northwestern region* samples collected biweekly between March, 2011 and February, 2012. **b** *Eastern region* samples collected with a periodicity of one sample every 2 months between

September, 2011 and April, 2013. Uruguayan Seasons are as follow: March 21 to June 20 (Autumn), June 21 to September 20 (Winter), September 21 to December 20 (Spring) and December 21 to March 20 (Summer). A proportion of the G- and P-types detected in each season is shown in **a** and **b**

strain obtained from a clinical sample of a hospitalized child with acute gastroenteritis in Salto city during 2011. From the nine strains classified as P[8]-3, seven were detected in the Eastern region and the remaining two in the

Northwestern region. All of the P[8]-1 strain were detected in Northwestern region (Fig. 3b, middle part). Four strains belonged to the genotype P[4], three were detected in the Northwestern region and the other one in the Eastern

**Fig. 3** Maximum likelihood phylogenetic tree analysis of VP7 and VP8\* partial gene nucleotide sequences of group A rotavirus (RVA) strains detected in sewage of six cities located in the Northwestern and Eastern regions of Uruguay. Strains in the trees are shown by name following the RV strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Prototype strains previously described are also shown by *accession numbers*. Numbers at the nodes in the tree indicate bootstrap values (only values above 70 % are shown). The scale bar at the bottom represents substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Vaccine strains are marked with an empty circle. Strains isolated in this study at the Northwestern region of Uruguay are marked with a filled square. Strains isolated in this study at the Eastern region of Uruguay are marked with a filled triangle. Uruguayan strains previously described that were detected from clinical samples collected from hospitalized children with acute diarrhea in Salto city, Uruguay, between 2011 and 2012, are marked with a filled circle. In a the results obtained for VP7 gene are shown; the results found for VP8\* gene are shown in b

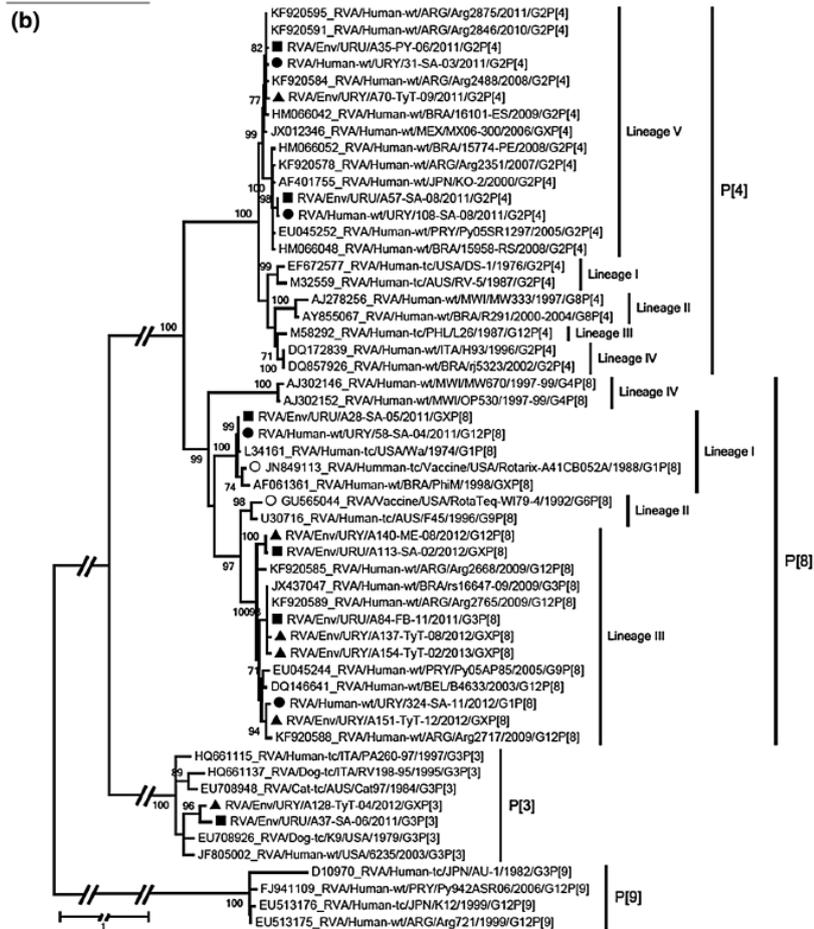


region, and all of them clustered inside lineage V together with G2P[4] strains obtained from clinical samples of Uruguay (Salto city), Brazil and Argentina, collected in the same period (Fig. 3b, upper part). Two strains were confirmed to belong to the genotype P[3], one strain was detected in the Northwestern region in 2011 and the other one in the Eastern region in 2012, and clustered together with human and animal G3P[3] prototype strains (Fig. 3b, bottom part).

**Discussion**

In the present study, RVA G- and P-types characterization by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis from sewage samples, was performed for the first time in six different cities of Uruguay. So far, only one previous study recently published analyzed G- and P-types from sewage by using phylogenetic analysis (Ruggeri et al. 2015). Here, the phylogenetic analysis approach revealed the circulation

Fig. 3 continued



of common, emerging, and uncommon human genotypes, furthermore allowed the identification of the lineage inside the corresponding genotype. The G- and P-types circulating in the four cities located in the Northwestern region were previously determined by SNM RT-PCR methodology; however, the phylogenetic analysis made in this study allowed the identification of emerging and uncommon genotypes for which genotypes-specific primers are not included in the SNM RT-PCR methodology that were used (Victoria et al. 2014). In accordance with the recent published work of Victoria et al. (2014), a high positivity rate of RVA was observed in this study for the Eastern region, it was even higher than the observed for the Northwestern region.

The comparison between RVA clinical and environmental strains from the same location and years are very useful to determine if the strains that are being

disseminated in the environment correspond with those that are causing acute gastroenteritis in children, as previously described (Kamel et al. 2010; Ruggeri et al. 2015). Unfortunately, only two studies describing RVA genotypes in clinical samples were carried out in Uruguay until now (Berois et al. 2003; Tort et al. 2015). Nucleotide sequences from these two studies were included in the phylogenetic analysis made in this study, with special attention to the ones identified more recently. Regarding the common (G1, G2, P[4], and P[8]) and emerging (G12) G- and P-types detected, the same genotypes and lineages were detected in environmental and clinical samples, both kind of samples matrix clustered together in all cases with very high bootstrap value support in the phylogenetic trees. These findings suggest that the same common and emerging strains that were detected from clinical samples in Salto (Tort et al. 2015), could have been excreted by children

with acute gastroenteritis from the other five cities that were analyzed in this study. However, in order to confirm these observations, it was not possible to obtain clinical specimens from hospitalized children with gastroenteritis from the other five cities.

With regard to the differences observed in the geographical distribution of the G- and P-types detected in Northwestern and Eastern regions, the prevalence of VP7 and VP4 genotypes commonly related to DS-1 like gene constellation (i.e., G2 and P[4]) observed for the Northwestern region during 2011, was also observed in RVA positive clinical samples of hospitalized children with acute gastroenteritis in the same year, from Salto city, an Uruguayan city from the same region (Tort et al. 2015). Even more, these G2 and P[4] clinical strains clustered together with the G2 and P[4] environmental strains detected in this study, with a high bootstrap value support. In accordance with this result, a high prevalence of genotype G2P[4] in Brazil in 2011 (reaching a detection rate of 50 % of the positive samples), was observed (Gómez et al. 2014a). Additionally, in a recent study made in Argentina, the G2P[4] was also the most prevalent genotype detected in 2010–2011 among hospitalized children with acute gastroenteritis from Buenos Aires, reaching around 80 % of the genotypes detected in 2011 (Mandile et al. 2014). Furthermore, the G2 and P[4] environmental strains detected in this study, clustered together with G2 and P[4] contemporary strains detected by Gómez et al. (2014a, b, c) and Mandile et al. (2014), in the neighboring countries Brazil and Argentina, respectively. Regarding the predominance of VP7 and VP4 genotypes commonly related to Wa-like gene constellation (i.e., G1, G12, and principally P[8]) during 2012 and 2013 for the Eastern region, a same predominance was also observed in RVA positive clinical samples of hospitalized children with acute gastroenteritis in 2012, from Salto city (Tort et al. 2015).

A recent increase detection rate of the genotype G2P[4] was observed in Latin American region as a continental phenomenon; and, in Brazil, a predominance of this genotype was observed after the establishment of a NIP using the RV1 vaccine (Esteban et al. 2010; Martínez et al. 2010; Gómez et al. 2014a). There are actually two theories, not mutually exclusive, proposed to explain the high prevalence of G2P[4] concomitant with RV1 introduction in some Latin American countries: (i) RV1 introduction created selective conditions favoring the emergence of G2P[4] viruses (supported by the fact that this strain is fully heterotypic—does not share either the VP4, VP7, or any other VPs or NSPs genotypes specificity—with the RV1 strain, G1P[8]) (Matthijssens and Van Ranst 2012), (ii) increased incidence of G2P[4] related to the common natural fluctuation observed for RVA genotypes, supported by the fact of the concomitant prevalence of G2P[4] in

Latin American countries were a NIP against RVA were not implemented (Martínez et al. 2010; Mandile et al. 2014). The results obtained in the present study are in accordance with previously observation in Uruguayan contemporary clinical samples (Tort et al. 2015), and, in this sense, support the second proposed theory, since the VP4 and VP7 genotypes commonly related to DS-1-like constellation that were predominant during 2011 were not detected in the environment in the next 2 years, in a country where RV1 has not yet been implemented in the NIP. The phylogenetic analysis showed that all the G2 and P[4] Uruguayan RVA environmental strains clustered together with the actual most commonly detected G2P[4] strains, i.e., lineage II from the VP7 gene (Page and Steele 2004) and lineage V from the VP4 (VP8\*) gene (Espinola et al. 2008).

In this study, seasonality was observed with a RVA peak in winter, in the Northwestern region, which its in accordance with recent observation of two sequential winter epidemic peaks in the clinical surveillance made in Salto city, in 2011 and 2012 (Tort et al. 2015). This seasonality pattern has been previously demonstrated in clinical surveillances (Cook et al. 1990). On the other hand, regarding the Eastern region, no seasonality was observed. Seasonal occurrence of RVA in sewage with a detection peak in winter has been previously observed (Li et al. 2011). However, other studies in which clinical and environmental samples collected in the same locality and year were analyzed, a seasonality pattern was observed in the clinical surveillance contrary to the environmental surveillance were no specific seasonal trend was observed showing the occurrence of RVA throughout the year (Fumian et al. 2011; Ruggeri et al. 2015). In the present study, it was not possible to solve this issue, regarding the differences in the collection years from both regions.

Although it is not possible to make an association between G- and P-types in environmental samples because of the segmented nature of the RVA genome, in the majority of the samples when G- and P-types could be determined by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis from the same sample, an interesting observation of commonly associated G- and P-types was determined. This was observed not only for the common G/P combination in human (i.e., G1P[8], G2P[4]) but also for the emerging G12P[8] genotype and even for the G3P[3] genotype, an uncommon G/P combination in human, rarely detected in clinical surveillances. Only one exception was observed, with a G3P[8] strain, that has a G3-lineage I genotype commonly associated with P[3] (Thongprachum et al. 2013).

In the present study, only two G1 strains could be sequenced, and in one of them a P[8] genotype could also be determined. Both G1 strains were classified as

G1-lineage I (Arista et al. 2006), together with previously detected G1 Uruguayan strains (Berois et al. 2003; Tort et al. 2015). On the other hand, VP4 (VP8\*) gene phylogenetic analysis classified this strain as P[8]-lineage III (Arista et al. 2006). G1P[8] is the most prevalent strain circulating in human worldwide since 90's (Santos and Hoshino 2005), however, the prevalence of G1P[8] strains declined from 2000 onward, although it still remains as the most prevalent human RVA genotype (Bányai et al. 2012). A similar picture was also observed for Latin America region (Linhares et al. 2011). The result obtained in the present study are in accordance with recent results concerning G1P[8] detection from Uruguayan pediatric gastroenteritis cases (Tort et al. 2015), and with the recent observation of a pronounced lowering in the prevalence of G1P[8] strain since before 2006 in vaccinated (Brazil) and unvaccinated (Argentina and Paraguay) countries of Latin American region (Martínez et al. 2010; Carvalho-Costa et al. 2011; Mandile et al. 2014).

An interesting finding of this study was the detection of the G12 as an emerging genotype. G12 have emerged and spread in many countries worldwide, since the beginning of this millennium (Matthijnssens et al. 2010). Four lineages inside G12 have been described (Matthijnssens et al. 2010). From these, the lineage III associated with P[8] have been recently determined to be the responsible of their global spread and it is expected to be the sixth most common RVA G/P combination found in human in the near future (Matthijnssens et al. 2010). One of the two G12 positive samples obtained belongs to the major lineage III (and the P[8] genotype could also be determined from this sample), and the other one belong to lineage II (and not P-type could be determined). In South America, G12-lineage II (commonly associated with P[9] genotype and with an AU-1 like genome constellation) was first detected in Buenos Aires in 1999 and more recently in Brazil and Paraguay (Castello et al. 2006; Martínez et al. 2010; Gómez et al. 2014b). On the other hand, G12P[8] was detected for the first time in South America in Argentina, in 2009 (Stupka et al. 2012), and more recently in Brazil (Gómez et al. 2014b). Similar results were obtained in a recently performed study, in which G12P[8] and G12P[9] were detected from Uruguayan pediatric gastroenteritis cases from Salto city (Tort et al. 2015), confirming the circulation of these two G12 lineages in the Northwestern and Eastern region of the country. Finally, the detection of these two lineages of the G12 RVA genotype is important for the vaccination programs against RVA being carried in all regions of the world, since G12 is not included in the formulation of the two most commonly used vaccines, RV1 and RV5 (Ruiz-Palacios et al. 2006; Vesikari et al. 2006).

Of outstanding interest in this study, was the detection of uncommon VP7 and VP4 genotypes related to AU-1 like

gene constellation (i.e., G3-lineage I and P[3]) (Matthijnssens and Van Ranst 2012), that were detected in both regions studied in 2011 and 2012. Furthermore, the G3-lineage I and P[3] were simultaneously detected in one sample (A37 strain). All of the G3 Uruguayan environmental strains detected in the present study belong to lineage I, and were phylogenetically distant to the globally common G3P[8] cluster (G3-lineage III) (Bányai et al. 2012; Thongprachum et al. 2013), and to the recently G3P[8] strains detected in pediatric cases in Uruguay (Salto city) and Brazil (Tort et al. 2015; Gómez et al. 2014c). The G3P[3] genotype is frequently detected in cats and dogs, and in contrast, its detection in humans is very uncommon (Matthijnssens et al. 2011b). However, this genotype has been sporadically detected in children either from symptomatic or asymptomatic cases (Banerjee et al. 2007; Luchs et al. 2012). The detection of this genotype only from environmental samples and not from contemporary clinical samples in Uruguay (Tort et al. 2015), support the hypothesis that the fact that G3P[3] not remain in circulation in humans, it may be because that this strain does not achieve the fitness required to become a successful human pathogen. Furthermore, all G3P[3] infections identified so far have been detected in children, indicating that these age group may be more exposed to infection by this genotype than adults; presumably because of the close interactions between children and pets together with limited hygiene habits characteristic of the age. Alternatives hypothesis are that G3P[3] may cause a sub-clinical infection in adults or that previous RVA infection could provide some protection against symptoms (Luchs et al. 2012). Finally, other alternative hypothesis, is that the G3-lineage I and P[3] strains detected here were originated from cats/dogs that commonly live inside the house of human as pet, and so, the stool of these animals are discarded into the sewage system. In accordance with this last hypothesis, in a very recent study, canine Norovirus and canine Astrovirus have been detected from the same sewage samples set from the east region that were analyzed here, denoting a high presence of animal enteric viruses in these samples (Lizasoain et al. 2015).

In this study, G- and/or P-types belonged to globally common, emerging, and uncommon human RVA genotypes could be successfully determined from sewage samples through nucleotide sequencing and phylogenetic analysis in five cities from which clinical samples were not available; except for Salto city (Tort et al. 2015) in where the common and emerging genotypes observed in environmental samples were the same as the ones previously detected in clinical samples. The environmental monitoring with RVA genotype determination by sequence analysis is very useful as a complement of clinical surveillance since they allow the comparison between both kind of samples at

sequence level, and also reflect the RVA genotype diversity not only from the severe pediatric gastroenteritis cases that are commonly obtained from clinical samples, but also from young, adults and children with moderate illness cases or asymptomatic infections in the community. These results support the idea that monitoring sewage may be a good screening option for a rapid and economical overview of the circulating RVA genotypes in the surrounding human population and a useful approximation to study RVA epidemiology in a future vaccine monitoring program after their implementation in the NIP of Uruguay (Fumian et al. 2011; Bucardo et al. 2011).

**Acknowledgments** We want to thank the financial support by the program ‘‘Polo de Desarrollo Universitario’’ (PDU), Universidad de la República (UdelaR), Uruguay; Project PCPP 023/2011 of ‘‘Coordenación de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior’’ (CAPES, Brazil); ‘‘Agencia Nacional de Investigación e Innovación’’ project ANII-ALI-2009-1-1603; and project CSIC I+D 2010, Universidad de la República (UdelaR). We also thank ‘‘Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias’’ and ‘‘Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay’’, for technical assistance.

## References

- Arista, S., Giammanco, G. M., De Grazia, S., Ramirez, S., Lo Biundo, C., Colomba, C., et al. (2006). Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *Journal of Virology*, *80*, 10724–10733.
- Banerjee, I., Iturriza-Gomara, M., Rajendran, P., Primrose, B., Ramani, S., Gray, J. J., et al. (2007). Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3] human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India. *Journal of Medical Virology*, *79*(11), 1768–1774.
- Bányai, K., László, B., Duque, J., Steele, A. D., Nelson, E. A., Gentsch, J. R., et al. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, *30*(1), A122–A130.
- Berois, M., Libersou, S., Russi, J., Arbiza, J., & Cohen, J. (2003). Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo–Uruguay from 1996–1999. *Journal of Medical Virology*, *71*(3), 456–462.
- Bosch, A., Guix, S., Sano, D., & Píntó, R. M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(3), 295–301.
- Bucardo, F., Lindgren, P. E., Svensson, L., & Nordgren, J. (2011). Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PLoS One*, *6*(10), e25962.
- Carvalho-Costa, F. A., de Mello Volotão, E., de Assis, R. M., Fialho, A. M., de Andrade, J. D. S., Rocha, L. N., et al. (2011). Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005–2009. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *30*(1), S35–S41.
- Castello, A. A., Argüelles, M. H., Rota, R. P., Olthoff, A., Jiang, B., Glass, R. I., et al. (2006). Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(6), 2046–2050.
- Cook, S. M., Glass, R. I., LeBaron, C. W., & Ho, M. S. (1990). Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin of the World Health Organization*, *68*(2), 171–177.
- Das, B. K., Gentsch, J. R., Cicirello, H. G., Woods, P. A., Gupta, A., Ramachandran, M., et al. (1994). Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*, 1820–1822.
- Espinola, E. E., Parra, G. I., Russomando, G., & Arbiza, J. (2008). Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: Analysis of Paraguayan strains. *Infection, Genetics and Evolution*, *8*(1), 94–99.
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., & Arias, C. F. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, *42*(10–11), 2618–2628.
- Esteban, L. E., Rota, R. P., Gentsch, J. R., Jiang, B., Esona, M., Glass, R. I., et al. (2010). Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004–2007: Reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *Journal of Medical Virology*, *82*(6), 1083–1093.
- Estes, M., & Greenberg, H. (2013). Rotaviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, et al. (Eds.), *Fields virology* (6th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer business/Lippincott Williams and Wilkins.
- Fumian, T. M., Leite, J. P., Castello, A. A., Gaggero, A., Caillou, M. S., & Miagostovich, M. P. (2010). Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *Journal of Virological Methods*, *170*(1–2), 42–46.
- Fumian, T. M., Leite, J. P. G., Rose, T. L., Prado, T., & Miagostovich, M. P. (2011). One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Research*, *45*, 5755–5763.
- Gentsch, J. R., Glass, R. I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., et al. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*, 1365–1373.
- Gómara, M. I., Cubitt, D., Desselberger, U., & Gray, J. (2001). Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(10), 3796–3798.
- Gómez, M. M., Carvalho-Costa, F. A., de Mello Volotão, E., Rose, T. L., da Silva, M. F., Fialho, A. M., et al. (2014a). Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A rotavirus strains during monovalent vaccine introduction in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, *28*, 486–494.
- Gómez, M. M., Carvalho-Costa, F. A., de Mello Volotão, E., Rose, T. L., da Silva, M. F., Fialho, A. M., et al. (2014b). A decade of G3P[8] and G9P[8] rotaviruses in Brazil: Epidemiology and evolutionary analyses. *Infection, Genetics and Evolution*, *28*, 389–397.
- Gómez, M. M., Resque, H. R., de Mello Volotão, E., Rose, T. L., da Silva, M. F. M., Heylen, E., et al. (2014c). Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, *28*, 385–388.
- Graham, D. Y., Dufour, G. R., & Estes, M. K. (1987). Minimal infective dose of rotavirus. *Archives of Virology*, *92*, 261–271.
- Hopkins, R. S., Gaspard, G. B., Williams, F. P., Jr, Karlin, R. J., Cukor, G., & Blacklow, N. R. (1984). A community waterborne gastroenteritis outbreak: Evidence for rotavirus as the agent. *American Journal of Public Health*, *74*(3), 263–265.
- I.N.E. (2011). Uruguayan National Institute of Statistic. <http://www.ine.gub.uy/censos2011/index.html> (Spanish). Accessed 11 Nov 2014.
- Kamel, A. H., Ali, M. A., El-Nady, H. G., Aho, S., Pothier, P., & Belliot, G. (2010). Evidence of the co-circulation of enteric

- viruses in sewage and in the population of Greater Cairo. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1620–1629.
- Li, D., Gu, A. Z., Zeng, S. Y., Yang, W., He, M., & Shi, H. C. (2011). Monitoring and evaluation of infectious rotaviruses in various wastewater effluents and receiving waters revealed correlation and seasonal pattern of occurrences. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1129–1137.
- Linhares, A. C., Stupka, J. A., Ciapponi, A., Bardach, A. E., Glujovsky, D., Aruj, P. K., et al. (2011). Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, 2(2), 89–109.
- Lizasoain, A., Tort, L. F. L., García, M., Gómez, M. M., Leite, J. P. G., Miagostovich, M. P., et al. (2015). Sewage surveillance reveals the presence of canine GVII norovirus and canine astrovirus in Uruguay. *Archives of Virology*. doi:10.1007/s00705-015-2571-3.
- Luchs, A., Cilli, A., Morillo, S. G., de Carmona, R. C., & Timenetsky, M. D. C. (2012). Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: Possible human-canine interspecies transmission. *Journal of Clinical Virology*, 54(1), 89–92.
- Mandile, M. G., Esteban, L. E., Argüelles, M. H., Mistchenko, A., Glikmann, G., & Castello, A. A. (2014). Surveillance of group A Rotavirus in Buenos Aires 2008–2011, long lasting circulation of G2P[4] strains possibly linked to massive monovalent vaccination in the region. *Journal of Clinical Virology*, 60(3), 282–289.
- Martínez, M., Amarilla, A. A., Galeano, M. E., Aquino, V. H., Fariña, N., Russomando, G., et al. (2010). Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay, 2006–2007. *Archives of Virology*, 155(4), 525–533.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., et al. (2011a). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology*, 156, 1397–1413.
- Matthijnsens, J., De Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, G. M., et al. (2011b). Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6), 1396–1406.
- Matthijnsens, J., Heylen, E., Zeller, M., Rahman, M., Lemey, P., & Van Ranst, M. (2010). Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Molecular Biology and Evolution*, 27(10), 2431–2436.
- Matthijnsens, J., & Van Ranst, M. (2012). Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current Opinion in Virology*, 2(4), 426–433.
- Metcalf, T. G., Melnick, J. L., & Estes, M. K. (1995). Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology*, 49, 461–487.
- Page, N. A., & Steele, A. D. (2004). Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from South Africa from 1984 to 1998. *Journal of Medical Virology*, 72(2), 320–327.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H., & Girones, R. (1998). Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4485–4488.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256.
- Prado, T., & Miagostovich, M. P. (2014). Environmental virology and sanitation in Brazil: A narrative review. *Cadernos de Saúde Pública*, 30(7), 1367–1378.
- Rajal, V. B., McSwain, B. S., Thompson, D. E., Leutenegger, C. M., Kildare, B. J., & Wuertz, S. (2007). Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research*, 41(7), 1411–1422.
- Rodriguez-Diaz, J., Querales, L., Caraballo, L., Vizzi, E., Liprandi, F., Takiff, H., et al. (2009). Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 387–394.
- Ruggeri, F. M., Bonomo, P., Ianiro, G., Battistone, A., Delogu, R., Germinario, C., et al. (2015). Rotavirus genotypes in sewage treatment plants and in children hospitalized with acute Diarrhea in Italy, 2010–2011. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 241–249.
- Ruiz-Palacios, G. M., Pérez-Schael, I., Velázquez, F. R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S. C., et al. (2006). Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*, 354(1), 11–22.
- Santos, N., & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 15(1), 29–56.
- Simmonds, M. K., Armah, G., Asmah, R., Banerjee, I., Damanka, S., Esona, M., et al. (2008). New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *Journal of Clinical Virology*, 42(4), 368–373.
- Steinmann, J. (1981). Detection of rotavirus in sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(4), 1043–1045.
- Stupka, J. A., Degiuseppe, J. I., Parra, G. I., & Network, Argentinean National Rotavirus Surveillance. (2012). Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008–2009: Whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *Journal of Clinical Virology*, 54(2), 162–167.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.
- Thongprachum, A., Chan-it, W., Khamrin, P., Okitsu, S., Nishimura, S., Kikuta, H., et al. (2013). Reemergence of new variant G3 rotavirus in Japanese pediatric patients, 2009–2011. *Infection, Genetics and Evolution*, 13, 168–174.
- Tort, L. F. L., Victoria, M., Lizasoain, A. A., Castells, M., Maya, L., Gómez, M. M., et al. (2015). Molecular epidemiology of group A rotavirus among children admitted to hospital in Salto, Uruguay, 2011–2012: First detection of the emerging genotype G12. *Journal of Medical Virology*, 87(5), 754–763.
- Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P. H., & Johne, R. (2013). Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *Journal of General Virology*, 94, 136–142.
- Vesikari, T., Matson, D. O., Dennehy, P., Van Damme, P., Santosham, M., Rodriguez, Z., et al. (2006). Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 354(1), 23–33.
- Victoria, M., Tort, L. F. L., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J. P. G., et al. (2014). Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 6(2), 116–124.
- Villena, C., Gabrieli, R., Pntó, R. M., Guix, S., Donia, D., Buonomo, E., et al. (2003). A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiology and Infection*, 131(3), 1105–1110.
- Walker, C. L., Rudan, I., Liu, L., Nair, H., Theodoratou, E., Bhutta, Z. A., et al. (2013). Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet*, 381(9875), 1405–1416.
- WHO. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods. *Immunization, Vaccines and Biologicals*, WHO/IVB/08.17.

**Online Resource 1.** Table of primers used for G/P detection and typing of group A rotavirus (RVA) by semi-nested multiplex RT-PCR and phylogenetic analysis.

PCR protocol	Primer		Sequence (5' to 3')	Sense	Genotype	Position (nt)	References
VP7 1 <sup>st</sup> round	9con1	5' end	TAGTCCTTTTAATGTATGG	+	All <sup>a</sup>	37-56	Das et al., 1994; Fischer et al., 2000
	9con2	3' end	GTATAAAATACTTGCCACCA	-		922-941	
VP7 2 <sup>nd</sup> round Multiplex <sup>b</sup>	9T-1	3' end	TCTGTCAAAGCAAATAATG	-	G1	176-195	Das et al., 1994
	9T-2	3' end	GTTAGAAATGATTCTCCACT	-	G2	262-281	
	9T-3	3' end	GTCCAGTTGCAGTGTAGC	-	G3	484-501	
	9T-4	3' end	GGGTCGATGGAAAATTCT	-	G4	423-440	
	9T-9	3' end	TATAAAGTCCATTGCAC	-	G9	131-147	
VP8* 1 <sup>st</sup> round	4con3	5' end	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	+	All	11-32	Gentsch et al., 1992
	4con2	3' end	ATTTCCGACCATTTATAACC	-		868-887	
VP8* 2 <sup>nd</sup> round Multiplex <sup>c</sup>	1T-1	3' end	TCTACTGGATAACGTGC	-	P[8]	339-356	Gentsch et al., 1992; WHO, 2009
	1T-1Wa	3' end	TCTACTGGGTTAACGTGC	-	P[8]	339-356	
	1T1-VN	3' end	TCTACTGGATCGACGTGC	-	P[8]	339-356	
	2T-1	3' end	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	-	P[4]	474-494	
	3T-1	3' end	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	-	P[6]	259-278	
	4T-1	3' end	TGAGACATGCAATTGGAC	-	P[9]	385-402	
	5T-1	3' end	ATCATAGTTAGTAGTCGG	-	P[10]	575-594	
	ND2	3' end	AGCGAACTCACCAATCTG	-	P[11]	116-133	
VP7 2 <sup>nd</sup> round <sup>d</sup>	VP7F	5' end	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	+	All	51-71	Gómara et al., 2001; WHO, 2009
	VP7Rdeg	3' end	AACTTGCCACCATYTYTTC	-		814-833	
VP8* 2 <sup>nd</sup> round <sup>e</sup>	VP4F	5' end	TATGCTCCAGTNAATTGG	+	All	132-149	Simmonds et al., 2008
	VP4R	3' end	ATTGCATTTCTTCCATAATG	-		775-795	

Degenerated primers are as follows: Y = C or T, N = A, G, C or T.

<sup>a</sup> "All" means that the pair of primers are consensus oligonucleotide primers to all the common G- and P-types that circulate in human worldwide.

<sup>b</sup> For the Multiplex PCR used to determine the G-type, the primer 9con1 was used as forward primers together with a mix of all the listed genotype-specific reverse primers.

<sup>c</sup> For the Multiplex PCR used to determine the P-type, the primer 4con3 was used as forward primers together with a mix of all the listed genotype-specific reverse primers.

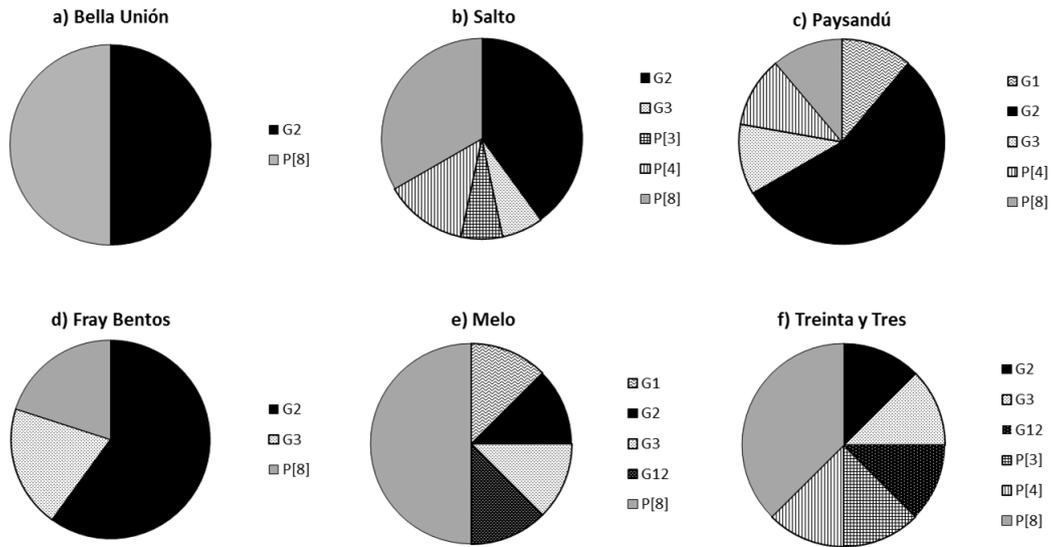
<sup>d</sup> The pair of primers VP7F/VP7Rdeg are consensus oligonucleotide primers to all the common G-types that circulate in human worldwide.

<sup>e</sup> The pair of primers VP4F/VP4R are consensus oligonucleotide primers to all the common P-types that circulate in human worldwide.

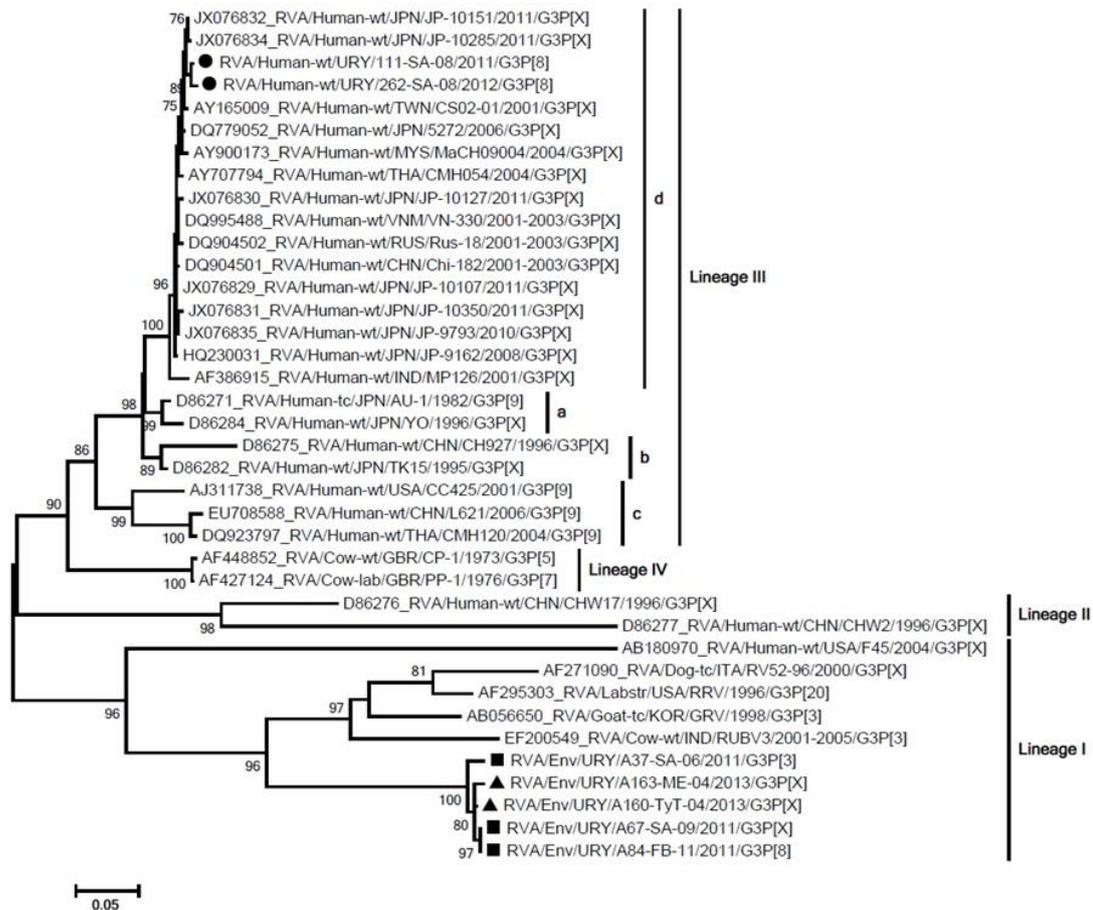
**Online Resource 2.** Table of sewage samples analyzed in this study with their respective G- and/or P-types types determined by phylogenetic studies.

Sample common name (Sample number-City-Month)*	Year of identification	G-type	P-type
A5-BU-03	2011	GX	P[8]
A7-PY-03	2011	GX	P[8]
A8-SA-03	2011	GX	P[8]
A11-SA-03	2011	GX	P[8]
A13-BU-03	2011	GX	P[8]
A21-SA-04	2011	GX	P[8]
A28-SA-05	2011	GX	P[8]
A35-PY-06	2011	G2	P[4]
A37-SA-06	2011	G3	P[3]
A38-FB-06	2011	G2	P[X]
A42-FB-07	2011	G2	P[X]
A43-PY-08	2011	G1	P[X]
A47-SA-07	2011	G2	P[X]
A48-BU-07	2011	G2	P[X]
A51-SA-09	2011	G2	P[X]
A52-FB-09	2011	G2	P[X]
A54-BU-09	2011	G2	P[X]
A55-PY-08	2011	G2	P[X]
A57-SA-08	2011	G2	P[4]
A63-PY-09	2011	G2	P[X]
A67-SA-09	2011	G3	P[X]
A69-SA-10	2011	G2	P[4]
A70-TyT-09	2011	G2	P[4]
A73-ME-09	2011	G2	P[X]
A84-FB-11	2012	G3	P[8]
A113-SA-02	2012	GX	P[8]
A128-TyT-04	2012	GX	P[3]
A134-TyT-06	2012	G12	P[X]
A137-TyT-08	2012	GX	P[8]
A140-ME-08	2012	G12	P[8]
A145-ME-10	2012	G1	P[8]
A148-ME-12	2012	GX	P[8]
A151-TyT-12	2012	GX	P[8]
A154-TyT-02	2013	GX	P[8]
A157-ME-02	2013	GX	P[8]
A160-TyT-04	2013	G3	P[X]
A163-ME-04	2013	G3	P[X]

\* *Sample number* = number assigned to the sample in our laboratory database (letter "A" refer to the Environmental origin of the sample, the first letter of the word "Environmental" in Spanish, to differentiate them from the clinical samples). *City* = two letter abbreviation of the city where the sample was collected (BU = Bella Unión, SA = Salto, PY = Paysandú, FB = Fray Bentos, ME = Melo, TyT = Treinta y Tres). *Month* = month when the sample was collected.



**Online Resource 3.** G- and P-types distribution of group A rotavirus (RVA) detected according to the collection sites in Northwestern -a) to d)- and Eastern -e) and f)- regions of Uruguay.



**Online Resource 4.** Maximum likelihood phylogenetic tree analysis of the G3 group A rotavirus (RVA) strains detected in sewage from Uruguay. Strains in the trees are shown by name following the RV strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Prototype strains previously described are also shown by accession numbers. Strains isolated in this study at the Northwestern region of Uruguay are marked with a filled square. Strains isolated in this study at the Eastern region of Uruguay are marked with a filled triangle. Uruguayan strains previously described that were detected from clinical samples collected from hospitalized children with acute diarrhea in Salto city, Uruguay, in 2011 and 2012, are marked with a filled circle. The trees were constructed with Tamura 3-parameter + G + I model as determined by using the jModelTest program. Numbers at the internal nodes in the tree indicate Bootstrap values (only values above 70% are shown). The scale bar at the bottom represents substitutions per nucleotide position (nt.subst./site).

**4.5 – Caracterización molecular, distribución geográfica y temporal de NV (GI y GII) en muestras ambientales de 6 ciudades localizadas al Noroeste y Este del país (Artículo 5). (Vinculado a objetivo específico 3.2.5)**

**Norovirus molecular detection in Uruguayan sewages samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time.**

**Objetivos:**

- Determinar la frecuencia de NV (GI y GII) en aguas residuales de 6 ciudades localizadas al Noroeste y Este del país.
- Realizar la secuenciación parcial de la región ORF-2 (cápside), para poder determinar mediante análisis filogenético los genotipos y variantes genéticas de NV GI y GII.
- Determinar la distribución geográfica y temporal de los genotipos y variantes de NV detectados.

**Revista:** artículo aceptado con modificaciones menores en *Journal of Applied Microbiology* para que evalúen su publicación.

**Norovirus molecular detection in Uruguayan sewages samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time.**

Victoria M<sup>1</sup>, Tort LFL<sup>1</sup>, Lizasoain A<sup>1</sup>, García M<sup>1</sup>, Castells M<sup>1</sup>, Berois M<sup>2</sup>, Divizia M<sup>3</sup>, Leite JPG<sup>4</sup>, Miagostovich MP<sup>4</sup>, Cristina J<sup>5</sup>, Colina R<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, Regional Norte, CENUR del Noroeste, Universidad de la República, Salto, Uruguay. <sup>2</sup>Virology Section, School of Sciences, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup>Laboratory of Environmental Virology, Department of Experimental Medicine and Surgery, Tor Vergata University, Rome, Italy. <sup>4</sup>Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup>Laboratory of Molecular Virology, Nuclear Investigation Center, School of Sciences, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

\*Corresponding author: Dr. Rodney Colina. Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Regional Norte, CENUR del Noroeste, Universidad de la República, Gral. Rivera 1350, 50.000, Salto, Uruguay. Phone: +598-47342924, FAX: +598-47322154, e-mail: rodneycolina1@gmail.com

**Abbreviated running headline:** Norovirus diversity in sewage

**Keywords:** norovirus, sewage, genotypes, variants replacement.

## **Abstract**

**Aims:** To determine the frequency and phylogenetic characterization of norovirus (NV) genogroup I (GI) and GII in Uruguay.

**Methods and Results:** 116 sewage samples were collected in six cities (Bella Unión, Salto, Paysandú, Fray Bentos, Melo and Treinta y Tres) from March 2011 to April 2013, viruses were concentrated by ultracentrifugation and NV studies were performed by semi-nested RT-PCR (partial capsid region). NV were detected in samples from all the cities and detected in 72% (84/116) of the samples with nine of them belonging to GI, 48 to GII and 27 to both genogroups. Remarkably, a high genetic diversity was identified: GII.2 (n=13), GII.4 (n=13), GI.1 (n=5), GI.4 (n=5), GI.8 (n=4), GII.13 (n=4), GII.1 (n=3), GII.6 (n=3), GI.3 (n=1), GI.5 (n=1), GI.6 (n=1), GII.3 (n=1), GII.17 (n=1). Interestingly, a complete replacement of GII.4 New Orleans 2009 by GII.4 Sydney 2012 variants during 2012 was evidenced.

**Conclusion:** This study reveals a high circulation of different NV GI and GII genotypes in sewage evidencing a replacement of GII.4 variants.

**Significance and Impact of Study:** This approach can be used as an indicator of the presence of a new GII.4 variant which can originate an increase of acute gastroenteritis outbreaks worldwide.

## Introduction

Norovirus (NV) is one of the most important pathogens causing epidemics of acute gastroenteritis worldwide both in developed and developing countries. They are responsible for more than 90% of viral gastroenteritis outbreaks worldwide with an estimated 1.1 million of hospitalizations and 218,000 deaths each year in children in developing countries (Patel et al 2009, 2008).

NV belongs to the *Norovirus* genus into the *Caliciviridae* family. They are classified in seven genogroups (GI to GVII) with human strains belonging to GI, GII and GIV (Zheng et al. 2006; Vinje, 2014). Within each genogroup, NV strains are classified into at least 40 different genotypes considering all genogroups. GII.4 is the most prevalent genotype in outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis worldwide, accounting for up to 80% of outbreaks (Kroneman et al., 2008; Vinje, 2014). The higher epidemiological fitness of GII.4 strains, associated with frequent outbreaks of acute gastroenteritis around the world, has been attributed to a higher rate of evolution of the capsid proteins influenced by at least four major factors: receptor switching, sequence space, duration of herd immunity and replication fidelity (Bull et al. 2011).

The transmission of these viruses is through the fecal-oral route either by direct contact with an infected individual, by the consumption of contaminated water or food or by direct contact with a contaminated surface or object (Green, 2013). They are transmitted very efficiently since they are excreted in high titers ( $10^{10}$  RNA genomic copies per gram of stool) in feces from infected persons, persist for long periods in the environment and present a low infectious dose (1,320 – 2,800 genome equivalents for Norwalk virus) (Chan et al. 2006; Atmar et al. 2014).

Detection of NV in the environment has been performed mainly in different kinds of environmental waters like sewage, surface and seawater evidencing a wide dissemination of these viruses throughout the environment (Kitajima et al. 2010; Fernandez et al. 2012; Hellmér et al. 2014; Victoria et al. 2014a). These studies reveal the presence of several genotypes from both GI and GII in these environmental waters. On the other hand, studies carried out with clinical samples have shown that the majority of the circulating NV strains in symptomatic persons are characterized as GII.4 (Tran et al. 2013; Andrade et al. 2014). This difference can be explained due to the detection of GI strains in environmental waters that could be excreted by asymptomatic patients or symptomatic infections in adults which are unlikely to seek out medical care,

remaining at home (Romani et al. 2012). Therefore, an environmental surveillance of NV determining the circulating genotypes is an effective approach in order to get insight into the molecular epidemiology of NV in the population served by a sanitation network.

The aim of this study was to determine the frequency and molecular characterization of NV from sewage samples collected in six cities located in the northwestern (Bella Unión, Salto, Paysandú and Fray Bentos) and eastern (Melo and Treinta y Tres) regions of Uruguay, South America.

## **Materials and methods**

### *Collection of samples and viral concentration method*

A total of 96 raw sewage samples (42 ml) from the northwestern region were collected biweekly from March 2011 to February 2012 in the cities of Bella Unión, Salto, Paysandú and Fray Bentos as described elsewhere (Victoria et al. 2014b). A total of 20 raw sewage samples (42 ml) from the eastern region were collected bimonthly from September 2011 to April 2013 in Treinta y Tres and Melo cities (figure 1).

Each sample was spiked with 500 µl of PP7 bacteriophage ( $1 \times 10^8$  genomic copies ml<sup>-1</sup>) used as an IPC (internal process control), kindly provided by Dr. Verónica Rajal from the National University of Salta, Argentina. Viral concentration was performed by ultracentrifugation of 42 ml of sewage samples (Pina et al. 1998; Fumian et al. 2010). Briefly, 42 ml of sewage were ultracentrifugated at 100,000 xg for 1 hour at 4 °C followed by a re-suspension of the pellet containing viral particles in 3.5 ml of 0.25 mol l<sup>-1</sup> glycine buffer (pH 9.5) and incubation on ice for 30 minutes with shaking every 5 minutes. The solution was neutralized with 3.5 ml of 2X phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and centrifuged at 12,000 xg for 15 minutes. The supernatant was ultracentrifuged again under the same ultracentrifugation conditions as mentioned above and the pellet was re-suspended with 200 µl of 1X PBS.

### *Nucleic acid extraction and cDNA synthesis*

200 µl of 1X PBS was added to the concentrated sample to a total of 400 µl to carry out the nucleic acid extraction by using the guanidinium/silica method obtaining a final volume of nucleic acid extract of 40 µl (Boom et al. 1990). cDNA synthesis was carried out with random hexamers (SBS Genetech<sup>TM</sup>) and *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Invitrogen<sup>TM</sup>) according to the manufacturer's instructions.

### *PCR for IPC and semi-nested PCR for norovirus genogroup I and II*

PP7 bacteriophage used as IPC was detected by qualitative PCR with primers directed to the replicase gene (73 bp fragment) of the genome as described by Rajal and co-workers (2007). NV were detected by semi-nested PCR with forward and reverse primers towards ORF1/ORF2 junction and 5' region of VP1 gene (region C), respectively, as described by Kitajima and co-workers (2010). Primers COG1F/G1SKR (380 bp) and G1SKF/G1SKR (330 bp) were used for the first and second round PCR for GI NV, respectively. For the amplification of GII NV, primers COG2F/G2SKR (390 bp) and G2SKF/G2SKR (340 bp) were used for the first and second round PCR, respectively.

#### *Sequencing and phylogenetic analysis*

Amplicons obtained from the second round PCR were purified with a commercial *AxyPrep™ PCR Cleanup Kit* (AXYGEN®) and sequenced with the same set of PCR primers by using a *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®) and the automated sequencer ABI3130 Genetic Analyzer in the Molecular Biology Unit at Pasteur Institute, Montevideo, Uruguay. Sequences were edited and aligned by using the DNASTAR Lasergene 7.0.0 program and the phylogenetic analysis was carried out with MEGA 5.2 Software by using the Maximum Likelihood method with Kimura two-parameters plus Gamma distribution model (Tamura et al. 2011).

Sequences obtained in this study were submitted to the GenBank® Database under the accession numbers KP185197 to KP185213 and KP185214 to KP185251 for NV GI and GII strains, respectively.

## **Results**

In order to determine the frequency and molecular epidemiology of NV in Uruguay, 96 and 20 sewage samples collected from the northwestern region and eastern region were analyzed, respectively. PP7 bacteriophage, used as an internal process control, was detected in all analyzed samples (n=116) evidencing no inhibition of the enzymatic reactions. NVs were detected in 72% (84/116) of all analyzed samples with nine samples positives only for GI, 48 only for GII and 27 for both GI and GII. The viruses were present in all analyzed cities with more than 60% of positivity in each, Treinta y Tres being the city with highest frequency of NV (100% - 10/10) followed by Melo (90% - 9/10), Fray Bentos (79% - 19/24) and Salto (67% - 16/24). The lowest frequency of NV was observed in Bella Unión and Paysandú with 63% of positivity (15/24). Regarding both GI and GII, they were detected in the six analyzed cities. GI

was detected with frequencies lower than 50% in five cities and only with higher frequency in Melo, whereas GII was detected in five of the six cities with frequencies higher than 50% (table 1).

The phylogenetic analysis of NV strains revealed a high circulation of different genotypes from both GI and GII in all the analyzed cities. The genotypes detected were as follows: GII.2 (n=13), GII.4 (n=13), GI.1 (n=5), GI.4 (n=5), GI.8 (n=4), GII.13 (n=4), GII.1 (n=3), GII.6 (n=3), GI.3 (n=1), GI.5 (n=1), GI.6 (n=1), GII.3 (n=1), GII.17 (n=1). In this study it was possible to determine the GII.4 variants circulating in the sewage samples (figure 2).

GI strains were detected mostly from March 2011 to January 2012 with co-circulation of up to three different genotypes in November 2011. Although five samples were positive for NV GI from February to December 2012, we couldn't obtain the sequences of these NV. GII strains circulated throughout the study period with a co-circulation of up to four genotypes and a clear prevalence of GII.4 in the latter part of the study corresponding to June to December 2012 (figure 3 a, b).

Interestingly, GII.4 New Orleans 2009 variant (n=6) was detected only in the first semester of 2012 (from January to June) and GII.4 Sydney 2012 variant (n=7) was exclusively detected in the second half of 2012 (from August to December) (figure 2b and figure 3c).

In each city, several different genotypes were detected ranging from three in Melo to eight in Fray Bentos. It is important to mention that a different pattern of genotype distribution was observed among strains from the northwestern and eastern region of Uruguay, where GII.4 was by far the most prevalent in the eastern region and only sporadically detected in the northwestern region (figure 4).

## **Discussion**

This environmental study describes the molecular epidemiology of NV in sewage samples collected from 2011 to 2013 in six cities covering the northwestern and eastern region of Uruguay. This is to our knowledge the first report in this country of the molecular characterization of NV, determining GI and GII genotypes and even GII.4 variants in this kind of environmental samples.

Considering the samples analyzed in the northwestern region of Uruguay (n=96), 68% of them were positive for NV by using the semi-nested PCR protocol described by Kitajima and co-workers (2010). In a previous study, our group analyzed these samples

for the presence of NV by using another semi-nested PCR protocol which uses primers towards the RNA dependent RNA polymerase (region A) detecting 51% of them positive for NV (Boxman et al. 2006; Victoria et al. 2014b). This comparison evidenced that the former protocol which combines primers towards the ORF1/ORF2 junction and the 5' region of VP1 is more sensitive for the detection of NV in environmental waters than the protocol with primers for the amplification of the region A. Furthermore, this protocol allows both NV genotyping and GII.4 variant assignment of the analyzed strain by sequencing this fragment (Mans et al. 2013; Vinje, 2014). The semi-nested PCR used in this study allowed the detection of NV in several samples that were tested as negative by real-time PCR in wastewater samples in Japan (Kitajima et al. 2012). This is another strong argument to use this semi-nested approach not only for NV genotyping but also for NV screening in this kind of environmental waters.

A continued presence of different GII genotypes was observed along the analyzed period; on the other hand, GI genotypes were not detected for nearly one year, although five samples were positive for GI in this period. The presence of GI and GII genotypes in environmental samples is not uniformly distributed in time as observed by Mans and co-workers (2013) where they observed a variation of GI and GII NV frequency from year to year of surveillance in sewage polluted rivers in South Africa with a gap of GII detection for six months. Up to four different genotypes were detected in a time-frame of one month, which is similar to the pattern observed in studies conducted in sewage from wastewater plant and sewage polluted rivers that evidenced the coexistence of multiple genotypes in each collection month suggesting that it is likely that different NV strains were circulating in human populations in the regions of our study (Kitajima et al. 2012; Mans et al. 2013).

In this study, six and seven different genotypes were detected for GI (n=17) and GII (n=38), respectively; GII.2, GII.4, GI.5 and GI.4 being the most frequently detected genotypes during the sampling period from March 2011 to April 2013. Several studies which analyzed sewage or sewage contaminated surface waters have shown the high frequency of GII.4 that can be explained by the global circulation at high frequency of this genotype which is mainly detected in pediatric populations (Siebenga et al. 2009; Tran et al. 2013; Andrade et al. 2014). Furthermore, GII.2 and GII.6 strains are also globally distributed although in a lower frequency (Tran et al. 2013). Several studies that were able to perform clinical surveillance of NV combined with screening of the virus in sewage samples observed a high prevalence of GII.4 in clinical and

environmental samples with identical or highly similar sequences from both kinds of samples. These results suggest that NV strains detected in sewage reflect the viruses circulating in the community irrespective of symptoms (Iwai et al. 2009; Kremer et al. 2011; Rajko-Nenow et al. 2013).

A different pattern of GI and GII genotype distribution was observed between both regions of Uruguay with a higher number of different genotypes in northwestern region and a prevalence of GII.4 in the eastern region. These patterns of NV circulation could be explained due to influence of the border population of two countries, Bella Unión, Salto, Paysandú and Fray Bentos being at the border with Argentina and Melo and Treinta y Tres at the border with Brazil. Several clinical studies have been conducted during approximately the same period of our study in the southern region of Brazil which determined the prevalence of GII.4 although other genotypes were also detected (Fioretti et al. 2011; Andrade et al. 2014; Raboni et al. 2014). On the other hand, in sewage polluted rivers in the region of Buenos Aires city, Argentina, GII.4 was also the most prevalent (Fernandez et al. 2012). Further studies with prolonged collection periods are necessary to confirm the different NV genotype patterns observed in both regions of Uruguay.

The phylogenetic analysis revealed the presence of 13 GII.4 strains that were only detected in 2012, six of them being assigned to New Orleans 2009 variant and the others seven strains assigned to Sydney 2012 variant. The temporal analysis of these variants shows that all New Orleans 2009 and Sydney 2012 strains were detected in the first and second semester of 2012, respectively, suggesting a possible substitution of the oldest variant by the newer one in the community. It has been reported that genotype GII.4 circulation at high frequencies cause a high number of outbreaks of gastroenteritis in humans due to the presence of different genetic variants (Bull et al. 2011). The replacement of a circulating GII.4 variant by an emergent one causing an elevated number of acute gastroenteritis outbreaks has been described in several surveillance studies worldwide (Siebenga et al. 2009; Eden et al. 2014; Fioretti et al. 2014). Recently, it has been observed that early pre-pandemic forms of the major pandemic GII.4 variants were circulating up to two years before their global epidemic spread (Eden et al. 2014). In a study performed in Sweden, where NV was analyzed in clinical and sewage samples, a peak in NV concentration in sewage was observed two to four weeks before a peak in the number of diagnosed patients with NV infections, mainly in hospital wards and elderly care center (Hellmér et al. 2014).

NV surveillance can be carried out through sewage samples analysis in order to determine the genetic diversity and circulation of different genotypes from both GI and GII, which are likely present in the local population during a specific period of time. These studies constitute a good temporal indicator about what is happening in the populations, taking into account symptomatic and asymptomatic persons infected with NV.

### **Acknowledgments**

We want to thank the financial support by the program “Polo de Desarrollo Universitario” (PDU), Universidad de la República (UdelaR), Uruguay; Project PPCP 023/2011 of “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES, Brazil) and project CSIC I+D 2010, Universidad de la República (UdelaR). We also thank Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias and Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay, for their technical assistance.

### **References**

- Andrade JD, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier MD, Nunes ZM et al. (2014) Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol* pii: S1386-6532(14)00324-2.
- Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH et al. (2014) Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis* 209(7), 1016-22.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noorda J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3), 495-503.
- Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans M. (2006) Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 108(3), 391-6.
- Bull RA, White PA. (2011) Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol* 19(5), 233-40.
- Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lee NL, Lai RW, Leung WK. (2006) Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 12(8), 1278-80.
- Eden JS, Hewitt J, Lim KL, Boni MF, Merif J, Greening G et al. (2014) The emergence and evolution of the NVel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology* 450-451, 106-13.
- Fajardo A, Tort FL, Victoria M, Fumian TM, Miagostovich MP, Leite JP, Cristina J, Colina R. (2014) Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the NVel GII.P7/GII.6 recombinant variant. *Infect Genet Evol* 28, 328-32.
- Fernández MD, Torres C, Poma HR, Riviello-López G, Martínez LC, Cisterna DM et al. (2012) Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. *Sci Total Environ* 437, 262-9.

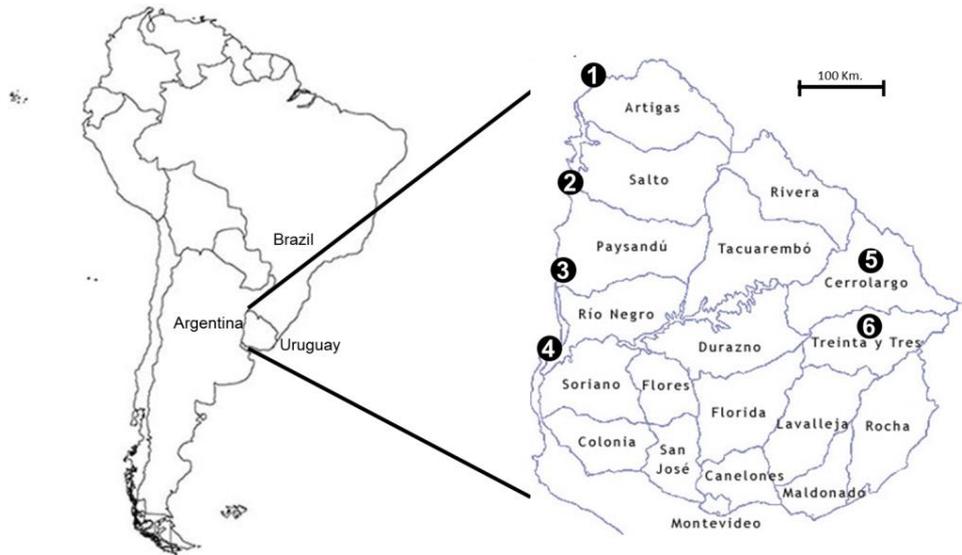
- Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM et al. (2012) Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One* 7(3), e33754.
- Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JP, Miagostovich MP. (2014) Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One* 9(3), e92988.
- Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, Miagostovich MP. (2011) Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(8), 942-7.
- Fumian TM, Leite JP, Castello AA, Gaggero A, Caillou MS, Miagostovich MP. (2010) Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods* 170(1-2), 42-6.
- Fumian TM, Justino MC, D'Arc Pereira Mascarenhas J, Reymão TK, Abreu E, Soares L, Linhares AC, Gabbay YB. (2013) Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Clin Virol* 58(1), 31-5.
- García C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. (2006) Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol* 44(8), 2997-3000.
- Green K. (2013) *Caliciviridae: The noroviruses*. In Fields virology ed. Knipe DM, Howley PM et al. pp 582–608. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hellmér M, Paxéus N, Magnus L, Enache L, Arnholm B, Johansson A et al. (2014) Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis a virus and norovirus outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 80(21), 6771-81.
- Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T et al. (2009) Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol* 75(5), 1264-70.
- Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H, Furumai H. (2012) Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. *J Appl Microbiol* 112(3), 605-13.
- Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. (2010) Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol* 44(18), 7116-22.
- Kremer JR, Langlet J, Skrabber S, Weicherding P, Weber B, Cauchie HM et al. (2011) Genetic diversity of noroviruses from outbreaks, sporadic cases and wastewater in Luxembourg 2008-2009. *Clin Microbiol Infect* 17(8), 1173-6.
- Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y et al. (2008) Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol* 46(9), 2959-65.
- Mans J, Netshikweta R, Magwalivha M, Van Zyl WB, Taylor MB. (2013) Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. *Epidemiol Infect* 141(2), 303-13.
- Marques Mendanha de Oliveira D, Souza M, Souza Fiaccadori F, César Pereira Santos H, das Dôres de Paula Cardoso D. (2014) Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic

- viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol* 86(9), 1569-75.
- Moyo S, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Vainio K, Maselle S, Langeland N. (2014) Genetic diversity of norovirus in hospitalised diarrhoeic children and asymptomatic controls in Dar es Salaam, Tanzania. *Infect Genet Evol* 26, 340-7.
  - Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. (2009) Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 44(1), 1-8. doi: 10.1016/j.jcv.2008.10.009.
  - Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. (2008) Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14(8), 1224-31.
  - Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. (1998) Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 64(11), 4485-8.
  - Raboni SM, Damasio GA, Ferreira CE, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR et al. (2014) Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(4), 428-35.
  - Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* 41(7), 1411-22.
  - Rajko-Nenow P, Waters A, Keaveney S, Flannery J, Tuite G, Coughlan S et al. (2013) Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland in 2010. *Appl Environ Microbiol* 79(8), 2578-87.
  - Romani S, Mohebbi SR, Hosseini SM, Azimzadeh P, Vahedi M, Derakhshan F, Zali MR. (2012) Prevalence of norovirus infection in children and adults with acute gastroenteritis, Tehran, Iran, 2008-2009. *Food Environ Virol* 4(1), 1-5.
  - Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL et al. (2009) Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 200(5), 802-12.
  - Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10), 2731-9.
  - Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. (2013) Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 56(3), 185-93.
  - Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MS, Le Moullac-Vaidye B, et al. (2013) Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. *PLoS One* 8(7), e69348.
  - Victoria M, Fumian TM, Rocha MS, Dalmao F, Leite JP, Girones R, Miagostovich MP. (2014a) Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J Appl Microbiol* 117(4), 1210-8.

- Victoria M, Tort LF, García M, Lizasoain A, Maya L, Leite JP, et al. (2014b) Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay river, Uruguay. *Food Environ Virol* 6(2), 116-24.
- Vinjé J. (2014) Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol* 53(2), 373-81.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2), 312-23.

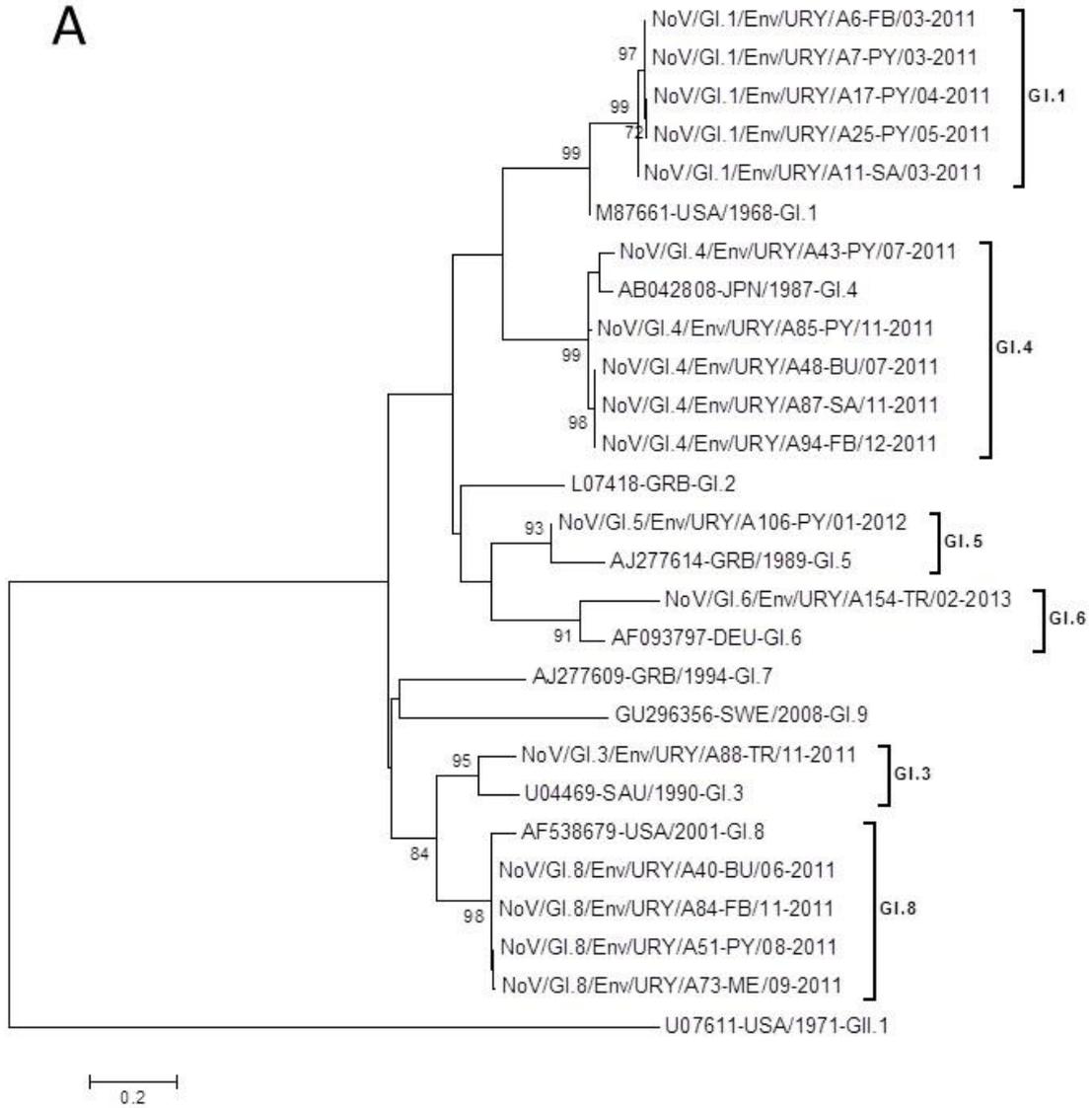
**Table 1.** Frequency of detection of norovirus (NV) genogroup I and II in sewage, according to the collection sites in the northwestern (Bella Unión, Salto, Paysandú and Fray Bentos) and eastern (Melo and Treinta y Tres) regions of Uruguay.

City	Positive (%)			Analyzed samples
	NoV	GI	GII	
Bella Unión	15 (63)	7 (29)	11 (46)	n=24
Salto	16 (67)	6 (25)	14 (58)	n=24
Paysandú	15 (63)	10 (42)	13 (54)	n=24
Fray Bentos	19 (79)	4 (17)	18 (75)	n=24
Melo	9 (90)	5 (50)	9 (90)	n=10
Treinta y Tres	10 (100)	4 (40)	10 (100)	n=10
<b>Total</b>	<b>84 (72)</b>	<b>36 (31)</b>	<b>75 (65)</b>	<b>n=116</b>



**Figure 1.** Map of Uruguay showing the collection sites (numbers within black circles) located in the northwestern (Bella Unión (1), Salto (2), Paysandú (3) Fray Bentos (4)) and eastern (Melo (5) Treinta y Tres (6)) regions of Uruguay.

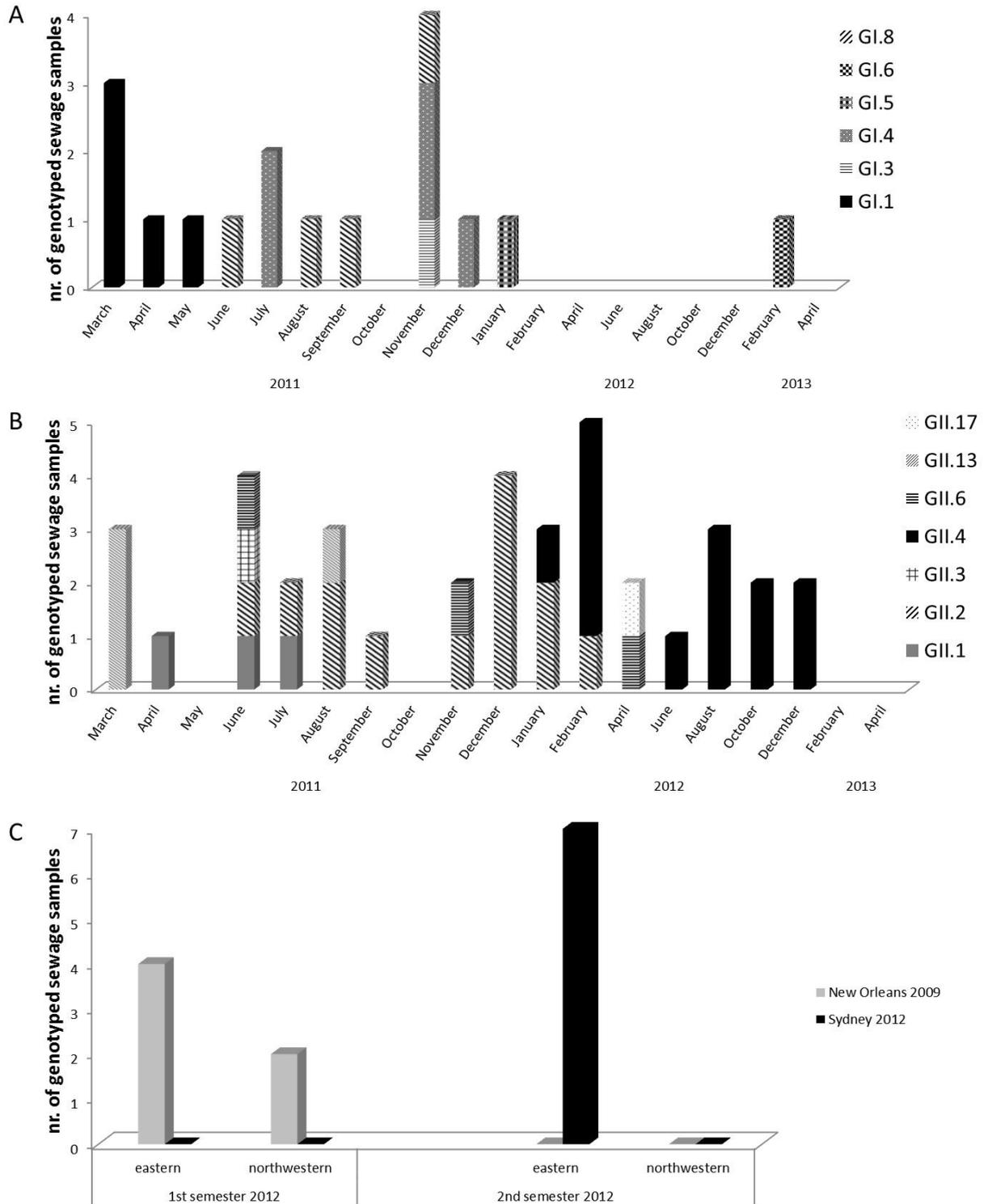
A



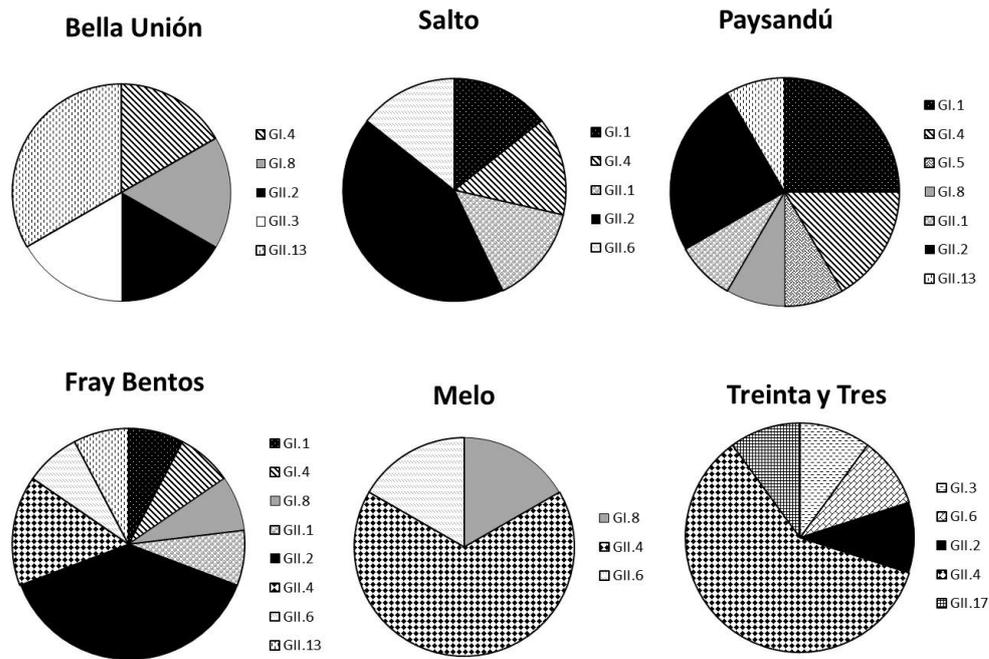
**B**



**Figure 2.** Phylogenetic tree performed with region C sequences of norovirus of GI (270 nt) (A) and GII (274 nt) (B). Bootstrap values over 70% are indicated in the nodes. Sequences obtained in this study are named by its number assigned in the laboratory, city and date (mm-yyyy) of collection. Reference sequences for each genotype are named by its GenBank accession number followed by the genotype. BU: Bella Unión; SA: Salto; PY: Paysandú; FB: Fray Bentos; ME: Melo; TR: Treinta y Tres.



**Figure 3.** Distribution of norovirus GI (A) and GII (B) genotypes detected in this study according to the month of the sample collection between March 2011 to April 2013. Temporal distribution of New Orleans 2009 and Sydney 2012 GII.4 variants is shown in C.



**Figure 4.** Distribution of genotypes of norovirus GI and GII detected according to the collection sites in the northwestern (Bella Unión, Salto, Paysandú and Fray Bentos) and eastern (Melo and Treinta y Tres) regions of Uruguay.

#### **4.6 – Reconstrucción demográfica y filogeográfica de cepas de NV GII.4 detectadas a partir de muestras ambientales. (Vinculado a objetivo específico 3.2.6)**

Como fue descrito en la sección anterior, fue observado un reemplazo completo de la variante de NV *GII.4 New Orleans* (2009), por la variante *GII.4 Sydney* (2012) durante el año 2012 a partir del análisis de las muestras ambientales colectadas (Sección de Resultados 4.5: Figura 2B, parte del medio; y Figura 3C). Con el objetivo de poder comprobar y dar soporte a este hallazgo, fue realizado un análisis espacio-temporal de estas cepas GII.4 detectadas, utilizando un análisis de coalescencia que nos permitió obtener una reconstrucción demográfica y filogeográfica de las dos variantes.

##### **4.6.1 – Metodología utilizada**

El tiempo al ancestro común más reciente (*tMRC*A), la historia demográfica y el análisis filogeográfico discreto de las cepas GII.4 Uruguayas fue estimado usando el paquete de programas bioinformáticos *BEAST v1.8.0* (Drummond et al., 2012). El programa *Beauti* del paquete *Beast v1.8.0* fue utilizado para preparar los datos para el análisis de coalescencia.

El modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a nuestro conjunto de secuencias fue determinado mediante la herramienta *FindModel* (Base de datos de HIV de Los Álamos, 2015) resultando en el modelo *GTR + G4* (*General Time Reversible + Gamma4*).

Previo al análisis de coalescencia, la herramienta *GARD* (*Genetic Algorithms for Recombination Detection*) disponible en la web: [www.Datamonkey.org](http://www.Datamonkey.org), fue utilizada para detectar posibles puntos de recombinación en las secuencias del alineamiento.

El análisis Bayesiano fue realizado utilizando como dato previo de árbol coalescente el *Skyline* bayesiano (Drummond et al., 2005), el modelo de sustitución nucleotídica *GTR + G4*, el modelo de reloj molecular relajado lognormal no-correlacionado (Ho et al., 2005; Drummond et al., 2006) y se realizó un procedimiento de selección variable de búsqueda estocástica bayesiana (*BSSVS*) (Lemey et al., 2009).

Fue utilizado como valor inicial una tasa de evolución de  $7,3 \times 10^{-3}$  sustituciones por sitio por año (s/s/a), calculada previamente para el gen de VP1 de GII.4 (Fioretti et al., 2014).

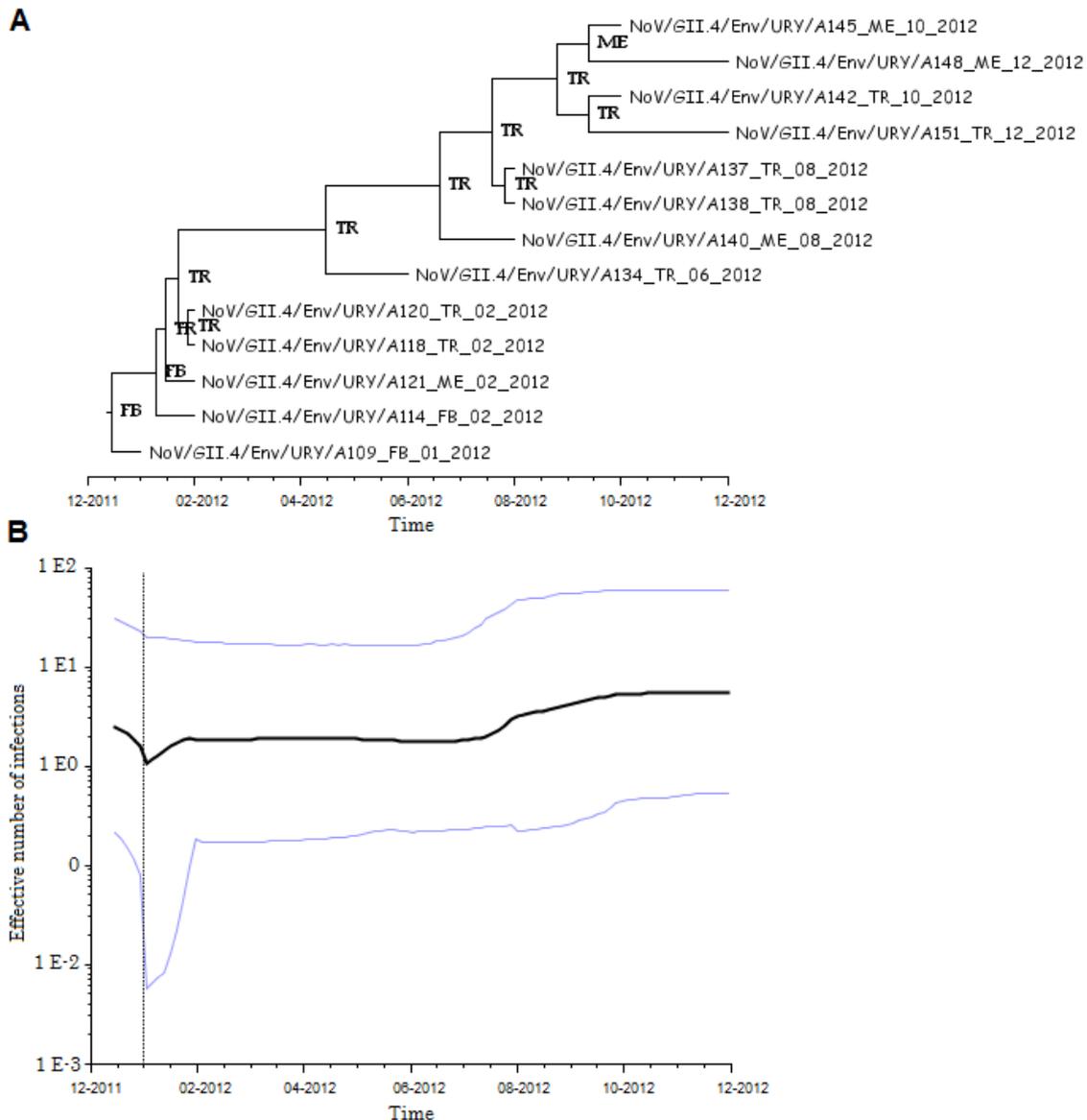
Se realizó un muestreo Monte Carlo vía Cadenas de Markov (*MCMC*) de  $1 \times 10^8$  generaciones. Cada combinación de datos fue corrida en el programa *Beast v1.8.0* y los resultados fueron luego visualizados con el programa *Tracer v1.5* (disponible en

<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>), descartando como calentamiento el 10% inicial de la corrida. Los valores del número efectivo de muestreo (*ESS*) fueron chequeados a fin de evaluar la convergencia del análisis, aceptando solamente valores mayores a 200 para todos los parámetros. La incertidumbre estadística de los datos se expresó mediante valores de 95% HPD (*Highest Probability Density*). El número efectivo de infecciones fue representado gráficamente usando el programa *Tracer v1.5.0*. El árbol de clados de máxima credibilidad (*MCCT*) generado en la corrida fue anotado con el programa *TreeAnnotator* del paquete de programas *BEAST v.1.8.0* y luego visualizado y editado con el programa *FigTree v 1.4.0* (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

#### **4.6.2 – Resultados**

Con la finalidad de realizar un estudio espacio-temporal de las cepas uruguayas de NV GII.4 previamente detectadas, realizamos un árbol de Clados de Máxima Credibilidad (*MCCT*) que confirmó la presencia de las variantes *New Orleans 2009* y *Sydney 2012* en Uruguay (Figura 4.6A).

Basado en el análisis de las secuencias uruguayas, la primera introducción de la variante *New Orleans 2009* en el país fue en diciembre del 2011 en la ciudad de Fray Bentos, y la primera introducción de la variante *Sydney 2012* fue en junio del 2012 en la ciudad de Treinta y Tres. Mediante la utilización de la metodología del *Skyline* bayesiano se pudo determinar la historia demográfica de las dos variantes previamente detectadas en las cepas GII.4 uruguayas. Como se puede ver en la figura 4.6B, dos aumentos moderados en el número de infecciones por NV-GII.4 son observado, que se corresponden con las introducciones de las variantes *New Orleans 2009* y *Sydney 2012* en Uruguay.



**Figura 4.6 – A)** Árbol de clados de máxima credibilidad (MCCT) realizado con secuencias parciales de la región C (302 pb) de la ORF2 (cápside) de cepas uruguayas de NV-GII.4. **B)** Gráfico *Skyline* Bayesiano de las variantes *New Orleans 2009* y *Sydney 2012* de las cepas GII.4 uruguayas. La línea negra representa la mediana del valor posterior y las líneas grises indican los intervalos de 95% HDP (*Highest Probability Density*).

#### 4.7 – Epidemiología y caracterización molecular de MAsV-1 y NV detectados en niños hospitalizados por GAI en Salto, durante el período de dos años completos (2011-2012). (Vinculado a objetivo específico 3.2.7)

Como se describe en la sección 4.3, fue realizada una investigación de RVA en muestras clínicas colectadas durante dos años completos (2011-2012), a partir de niños hospitalizados con Gastroenteritis Aguda en la ciudad de Salto. En este estudio, se pudo determinar una prevalencia alta de RVA en los casos de GAI, así como su distribución

por franja etaria, la estacionalidad de las infecciones por RVA y también se pudo caracterizar molecularmente los genotipos y linajes a partir de los RVA detectados mediante análisis filogenético. Esto último, permitió más adelante realizar un estudio comparativo de las cepas que circulan en estos casos clínicos con cepas de RVA detectadas en muestras ambientales de agua residual urbana (Sección 4.4).

En el caso de MAstV-1 y NV, estos virus fueron previamente detectados en una alta frecuencia en muestras ambientales de Uruguay, y también se pudo realizar una caracterización molecular detallada de los mismos, determinando a su vez su distribución geográfica y temporal (Lizasoain et al., 2015a – Anexo 1; Secciones 4.1 y 4.5). A su vez, en el caso de NV, este virus había sido detectado y caracterizado molecularmente a partir de muestras clínicas de casos de GAI de Salto colectadas durante el primer año de muestreo (Sección 4.2).

Debido a esto, en esta última sección de “materiales, métodos y resultados” se describe los estudios realizados sobre la epidemiología y caracterización molecular de MAstV-1 y NV a partir de las mismas muestras clínicas que fueron anteriormente analizadas para RVA, como se describe en la Sección 4.3.

#### **4.7.1 – Materiales y Métodos**

Las muestras clínicas analizadas, así como las metodologías de: i) extracción de ARN, ii) Retrotranscripción, iii) purificación de productos de PCR, iv) secuenciación de ADN, y v) análisis filogenéticos; fueron las mismas descritas previamente en la Sección 4.3. Los protocolos de PCR utilizados para la detección de MAstV-1 y NV, fueron los mismos que se describen en la Sección 4.1 y 4.5, respectivamente.

Cabe resaltar que para todas las muestras clínicas colectadas, se solicitó la firma por parte del responsable del paciente (ya que se trata de personas menores de edad), de un “Término de Consentimiento Libre y Aclarado” (TCLA) en el que se le explicaba brevemente al responsable por el paciente la finalidad con la que iba a ser colectada la muestra, manteniendo siempre el anonimato del paciente (4.7 – Anexos 1). También se le solicitó al personal médico responsable de la toma de las muestras clínicas, el llenado de una “ficha epidemiológica del paciente” junto con cada muestra colectada, en la que se recababa información sobre el paciente (edad, dirección, si posee mascotas, etc) y el cuadro clínico (síntomas, severidad, tratamiento, etc). Ambos archivos se adjuntan al final de esta sección (4.7 – Anexos 2).

Para el análisis de posibles eventos de recombinación en las cepas de MAstV-1, fueron utilizadas dos aproximaciones implementadas en el programa *SimPlot v3.5.1* (Lole et al., 1999) que permiten evidenciar discordancias filogenéticas que son señales de recombinación, y, a su vez, determinar el posible punto de recombinación: 1) un análisis de ventana basado en distancia (*sliding window analysis*) y 2) *Bootscaning*. El porcentaje de similitud entre cepas fue calculado mediante una matriz de identidad nucleotídica, la cual fue realizada a partir del mismo alineamiento utilizado para el análisis filogenético, usando el programa *BioEdit v7.2.5* (Hall, 1999).

## **4.7.2 – Resultados**

### **4.7.2.1 – Mamastrovirus-1**

Los MAstV-1 fueron detectados en 18 (10,3%) de las 175 muestras analizadas. No fueron detectadas muestras clínicas de vomito positivas para MAstV-1. Fueron observadas 5 co-infecciones entre RVA y MAstV-1 (2,8%). No fue observado un aumento en la severidad de los síntomas clínicos en estos pacientes co-infectados respecto a los que tenían una infección con un único virus. De estos 5 pacientes co-infectados, se pudo determinar el genotipo de RVA en tres de ellos: 2 fueron G12P[8], y el otro GXP[8]; solamente en uno de ellos, con una cepa de RVA perteneciente al genotipo G12P[8], se pudo determinar el genotipo de MAstV-1: HAstV2c (muestra 58, Figura 4.6.1; y Figura 3a de la Sección 4.3).

De las 18 muestras positivas para MAstV-1, 14 (78%) pudieron ser secuenciadas y sometidas a análisis filogenético (Figura 4.7.1). Las cuatro muestras positivas que no pudieron ser caracterizadas, fue debido a que no se pudo obtener su secuencia nucleotídica por la baja concentración observada en los productos de PCR de las mismas. Las cuatro muestras presentaban una banda de PCR de tamaño esperado, pero con una intensidad muy tenue. Varios intentos fueron realizados para intentar aumentar su concentración, pero no se logró dicho cometido.

El análisis filogenético realizado nos permitió observar que de las 14 muestras secuenciadas: i) 6 pertenecieron al genotipo 1, linaje a – HastV-1a –, agrupando junto con cepas ambientales previamente detectadas en Uruguay, en dos *clusters* separados dentro de este linaje (Figura 4.7.1, parte de abajo); ii) 4 fueron clasificadas como genotipo 2, linaje c – HastV-2c –, agrupando en un mismo *cluster* con cepas ambientales previamente detectadas en Uruguay (Figura 4.7.1, parte de arriba); y iii) las restantes 4 pertenecieron al genotipo 3 – HastV-3 – (Figura 4.7.1, parte del medio).

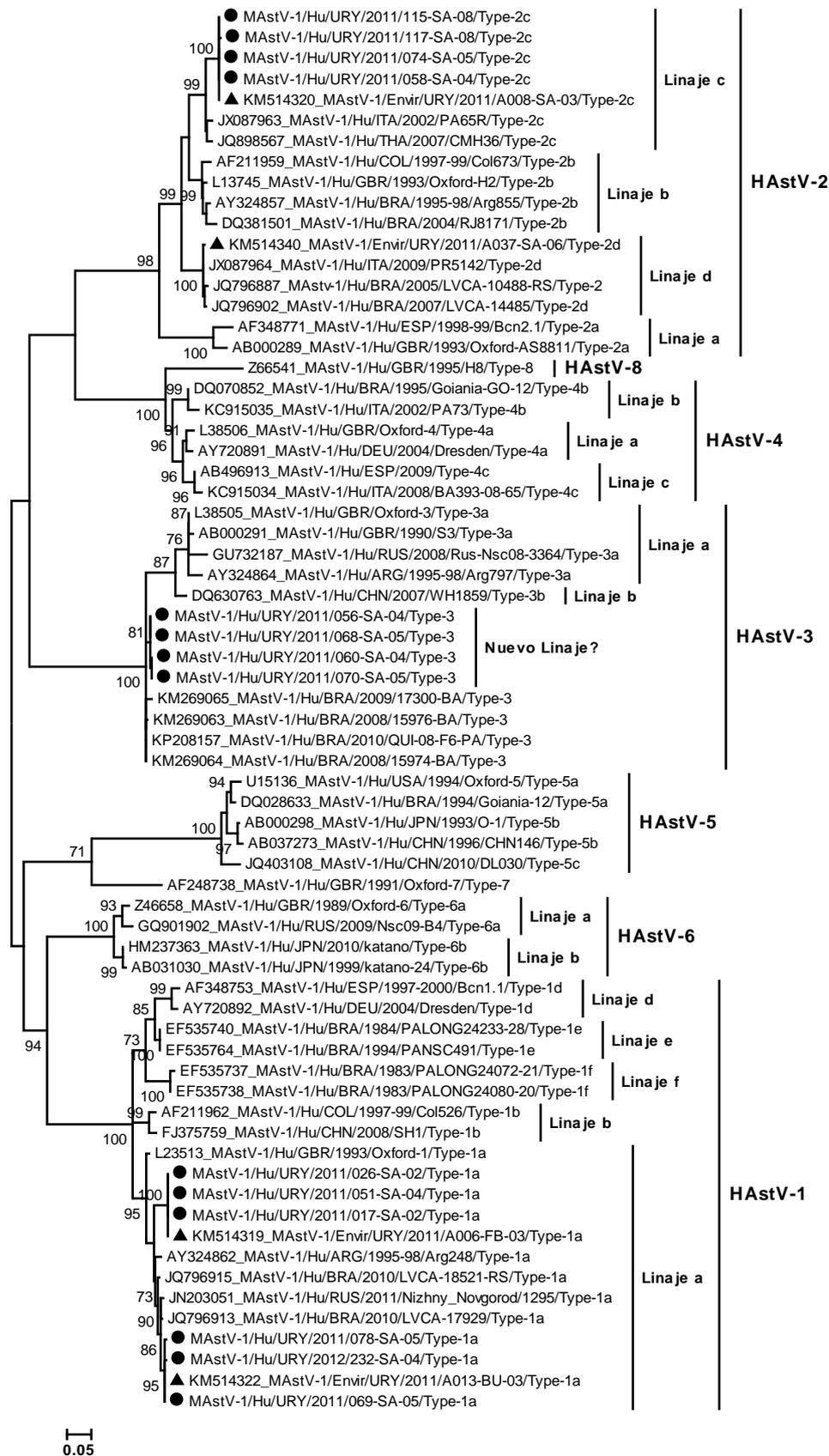


Figura 4.7.1 – Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud realizado con secuencias correspondientes a la región C, del ORF2 (cápside), de Astrovirus humanos clásicos (MAstV-1) detectados a partir de muestras clínicas de niños hospitalizados con GAI en Salto. Las cepas en el

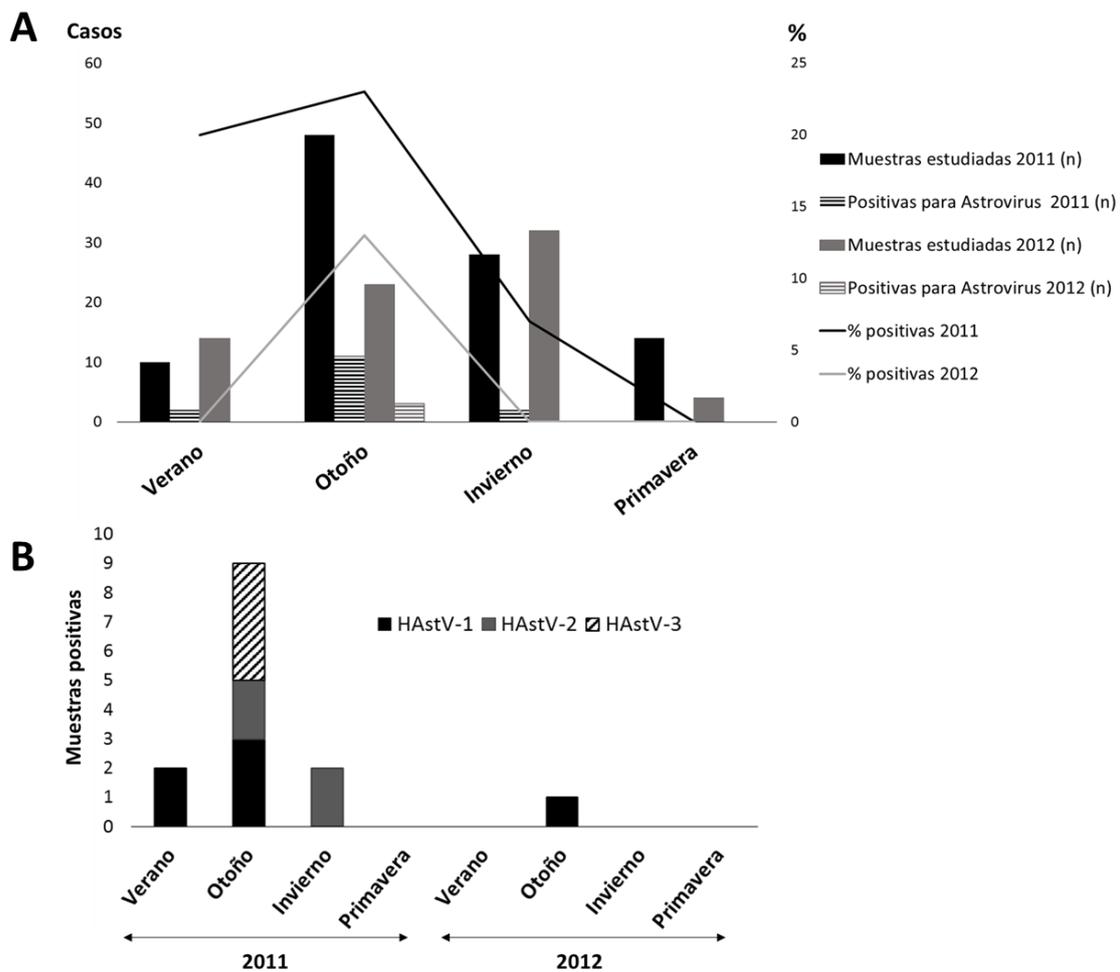
árbol se muestran de acuerdo a la nomenclatura propuesta por *Martella y col. (2014)*. Las cepas prototipos descritas previamente se muestran en el árbol precedidas por el número de acceso a su secuencia nucleotídica en el *GenBank*. Los números en los nodos representan los valores de *Bootstrap* obtenidos (solo se muestran valores mayores a 70%). La barra de escala en la parte de abajo de la figura representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Las cepas detectadas en muestras clínicas de Salto están marcadas en el árbol con un **círculo negro**. Cepas uruguayas detectadas previamente en muestras ambientales de agua residual están marcadas en el árbol con un **triángulo negro**.

Cabe resaltar en el caso de las cepas uruguayas pertenecientes al HAstV-3, que cepas pertenecientes a este genotipo no habían sido previamente detectadas en los estudios realizados a partir de muestras ambientales de Uruguay. Por otro lado, también se pudo observar que las cepas uruguayas pertenecientes al HAstV-3 no clasificaron dentro de ninguno de los dos linajes descritos actualmente para el HAstV-3. También se pudo observar que cepas de HAstV-3 recientemente detectadas en Brasil, tampoco agruparon dentro de ninguno de los dos linajes descritos. Debido a esto, fue realizada una matriz de identidad nucleotídica con la finalidad de determinar si las cepas uruguayas pertenecen o no a un nuevo linaje dentro del HAstV-3 de acuerdo a los valores de *cutt-off* de identidad nucleotídica descritos en la nueva clasificación propuesta para los MAstV-1 (Figura 4.7.2).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<i>MAstV-1/Hu/URY/2011/056-SA-04/Type-3</i>	A ID									
<i>MAstV-1/Hu/URY/2011/060-SA-04/Type-3</i>	B 99,7	ID								
<i>MAstV-1/Hu/URY/2011/068-SA-05/Type-3</i>	C 100	99,7	ID							
<i>MAstV-1/Hu/URY/2011/070-SA-05/Type-3</i>	D 99,7	100	99,7	ID						
<i>AF141381_MAstV-1/Hu/DEU/1999/Berlin/Type-3a</i>	E 93,1	92,8	93,1	92,8	ID					
<i>DQ630763_MAstV-1/Hu/CHN/2007/WH1859/Type-3b</i>	F 92,8	92,5	92,8	92,5	94,8	ID				
<i>KM269065_MAstV-1/Hu/BRA/2009/17300-BA/Type-3</i>	G 97,9	97,7	97,9	97,7	92,8	92,2	ID			
<i>KM269063_MAstV-1/Hu/BRA/2008/15976-BA/Type-3</i>	H 98,8	98,5	98,8	98,5	93,6	93,1	98,5	ID		
<i>KM269064_MAstV-1/Hu/BRA/2008/15974-BA/Type-3</i>	I 99,1	98,8	99,1	98,8	93,9	93,3	98,8	99,7	ID	
<i>KP208157_MAstV-1/Hu/BRA/2010/QUI-08-F6-PA/Type-3</i>	J 99,1	98,8	99,1	98,8	93,9	93,3	98,8	99,7	100	ID

**Figura 4.7.2 – Matriz de identidad nucleotídica entre las cepas de Astrovirus uruguayas de genotipo HAstV-3 detectadas a partir de muestras clínicas de niños hospitalizados con GAI en Salto, comparadas con las cepas prototipo de HAstV-3a y -3b (según Martella et al., 2014), y con cepas contemporáneas de Brasil.** Los valores corresponden a porcentajes de identidad nucleotídica entre las cepas. Sombreado en **amarillo** se muestran los valores de la comparación de las cepas Uruguayas con la cepa prototipo de HAstV-3a. Sombreado en **celeste** se muestran los valores de la comparación de las cepas Uruguayas con la cepa prototipo de HAstV-3b. . Sombreado en **rojo** se muestran los valores de la comparación de las cepas Uruguayas con las cepas contemporáneas del mismo genotipo detectadas en Brasil.

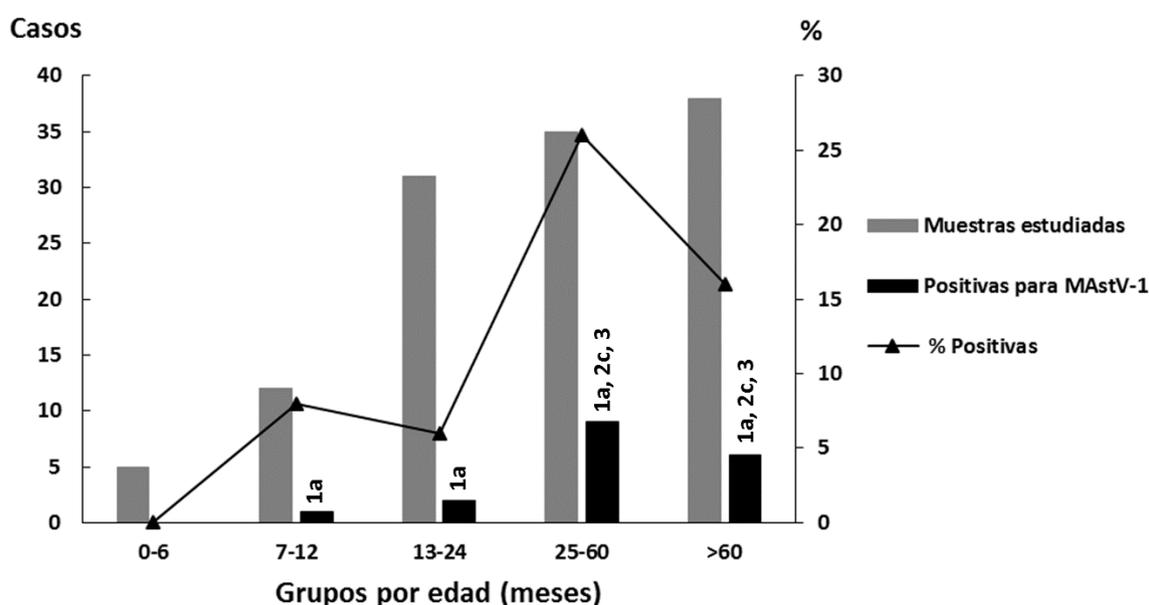
Según esta nueva clasificación, dentro del genotipo HAstV-3, para que una cepa sea considerada perteneciente a uno de los dos linajes descritos, tiene que tener una identidad nucleotídica  $\geq 95\%$  con la cepa de referencia de cualquiera de los dos linajes (*Intra-lineage-id %*); por otro lado, para que una cepa sea considerada como perteneciente a un nuevo linaje dentro del HAstV-3, tiene que tener una identidad nucleotídica entre 91,9 y 93,5% con cualquiera de los dos linajes propuestos (*Inter-lineage-id %*). En el caso de las cepas de HAstV-3 uruguayas, éstas presentaron una identidad nucleotídica entre 92,5 y 93,1% con las cepas de referencia de los dos linajes de HAstV-3, por lo que basándonos en esta clasificación éstas cepas podrían ser consideradas como pertenecientes a un nuevo linaje dentro de este genotipo (Figura 4.7.2).



**Figura 4.7.3** – A) Tasa de detección y estacionalidad de los Astrovirus humanos clásicos (MAstV-1) identificados por PCR en casos de GAI en Salto, durante dos años (enero de 2011 a diciembre de 2012). B) Distribución temporal de los genotipos de MAstV-1 detectados a partir de las muestras secuenciadas.

Verano: 21 de diciembre a 20 de marzo; Otoño: 21 de marzo a 20 de junio; Invierno: 21 de Junio a 20 de setiembre; Primavera: 21 de setiembre a 20 de diciembre.

Fue observado un pico de detección de MAstV-1 durante la estación de otoño para los dos años de estudio y la mayoría de los casos positivos fueron observados durante el año 2011, en tanto, durante el 2012, solo fue detectado en otoño (Figura 4.7.3A). La mayor cantidad de casos positivos fue observada en la estación de otoño del año 2011, estación en la que se observó también la mayor diversidad genética detectándose los 3 genotipos que fueron identificados en este estudio (HAstV-1, -2 y -3). El genotipo HAstV-1 fue detectado durante los dos años de estudio, en tanto los genotipos HAstV-2 y HAstV-3 fueron detectados solo en el año 2011 (Figura 4.7.3B).



**Figura 4.7.4 – Distribución de las infecciones de astrovirus humanos (MAstV-1) por grupo etario en niños hospitalizados por GAI en Salto, Uruguay, durante 2 años consecutivos (enero del 2011 a diciembre 2012).** En cada grupo etario se muestran los genotipos/linajes detectados.

La edad de los pacientes infectados con MAstV-1 fue de 11 meses a 51 años de edad. Siendo que la mayoría de los casos (89%), ocurrió en pacientes menores a 15 años de edad. Tomando en cuenta a los niños menores de 5 años de edad, la mayoría de los casos de infecciones con MAstV-1 fue observada en el grupo etario de 2 a 5 años de edad (75%) (Figura 4.7.4). Este grupo etario fue también el que presentó mayor positividad tomando en cuenta todos los grupos etarios (50%), seguido del grupo de pacientes mayores a 5 años (33%), el de niños de entre 1 y 2 años (11%) y el de niños

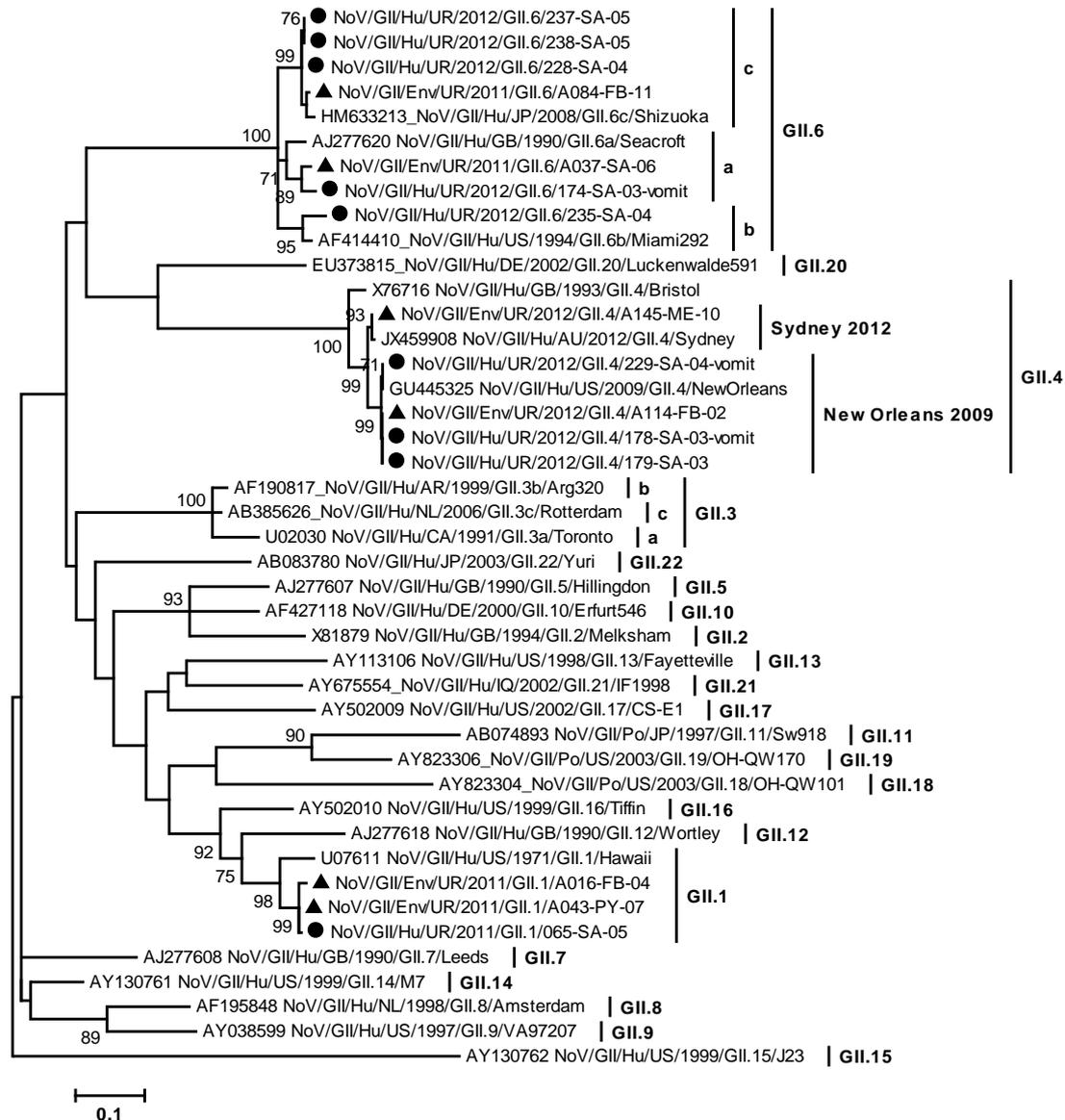
entre 7 y 12 meses (6%), de edad. No fueron observados casos positivos de MAstV-1 en bebés de 0 a 6 meses de edad. Tomando en cuenta todos los grupos etarios, la mayoría de los casos ocurrió en el grupo comprendido entre niños mayores a dos años, hasta adolescentes menores de 15 años (72%) de edad, donde también fue observada una mayor diversidad de cepas circulantes, detectándose los genotipos 1, 2 y 3 de MAstV-1 (Figura 4.7.4).

Por último, no fueron observadas cepas recombinantes en los MAstV-1 detectados en este estudio, en base al análisis de la región secuenciada (región C, ORF2).

#### **4.7.2.2 – Norovirus humanos GI y GII**

Los NV fueron detectados en 14 (8%) de las 175 muestras analizadas. Fueron detectadas cuatro muestras de vomito positivas para NV. Fue observada una mayor positividad de NV en las muestras de vomito 18% (4/22), que en muestras de materia fecal, 6,5% (10/153). Las 14 muestras positivas para NV, pertenecieron al Genogrupo 2 (GII), en tanto, en dos de ellas se observó una co-infección con el Genogrupo 1 (GI). De las 14 muestras positivas, se pudieron secuenciar NV pertenecientes al GII en 9 de ellas (64%), en tanto, no se pudo obtener la secuencia de las dos muestras positivas para GI. Como fue descrito anteriormente en la sección 4.3, en tres pacientes se pudo colectar en simultaneo una muestra de vómito y de materia fecal. Dos de los tres pacientes fueron positivos para RVA. El tercer paciente, que fue negativo para RVA, fue positivo para NV en vómito y materia fecal, lamentablemente no se pudo obtener la secuencia nucleotídica para poder determinar el genotipo.

Fueron observadas dos co-infecciones de NV + RVA (1,1%), una co-infección de NV + MAstV-1 (0,6%), y ninguna co-infección RVA + NV + MAstV-1 fue observada a partir de las muestras analizadas. No fue observado un aumento en la severidad de los síntomas clínicos en estos pacientes co-infectados respecto a los que tenían una infección con un único virus. Cabe resaltar que solo en 67 de los 175 casos analizados (38%), la muestra clínica vino acompañada de la Ficha Epidemiológica correspondiente (4.7 – Anexos 2). De aquellas muestras que sí vinieron acompañadas con Ficha Epidemiológica, se pudo observar que en los pacientes con cuadro clínico más severo (internación con hidratación oral y/o intravenosa), fueron detectados NV y RVA (no MAstV-1), de genotipo GII.4 (*New Orleans 2009*) y *DS-1-like*, respectivamente.



**Figura 4.7.5 – Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud realizado con secuencias correspondientes a la región C, del ORF2 (cápside), de Norovirus humanos del Genogrupo 2 (NV-GII) detectados a partir de muestras clínicas de niños hospitalizados con GAI en Salto.** Las cepas en el árbol se muestran de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Vinje y col. (2015). Las cepas prototipos descritas previamente se muestran en el árbol precedidas por el número de acceso a su secuencia nucleotídica en el *GenBank*. Los números en los nodos representan los valores de *Bootstrap* obtenidos (solo se muestran valores mayores a 70%). La barra de escala en la parte de abajo de la figura representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Las cepas detectadas en muestras clínicas de Salto están marcadas en el árbol con un **círculo negro**. Cepas uruguayas detectadas en muestras ambientales de agua residual están marcadas en el árbol con un **triángulo negro**.

El análisis filogenético realizado nos permitió observar que de las 9 muestras secuenciadas: i) 5 pertenecieron al genotipo GII.6: 3 agruparon dentro del GII.6c, una en el GII.6a, y la restante en el GII.6b (Figura 4.7.5, parte de arriba), agrupando las tres

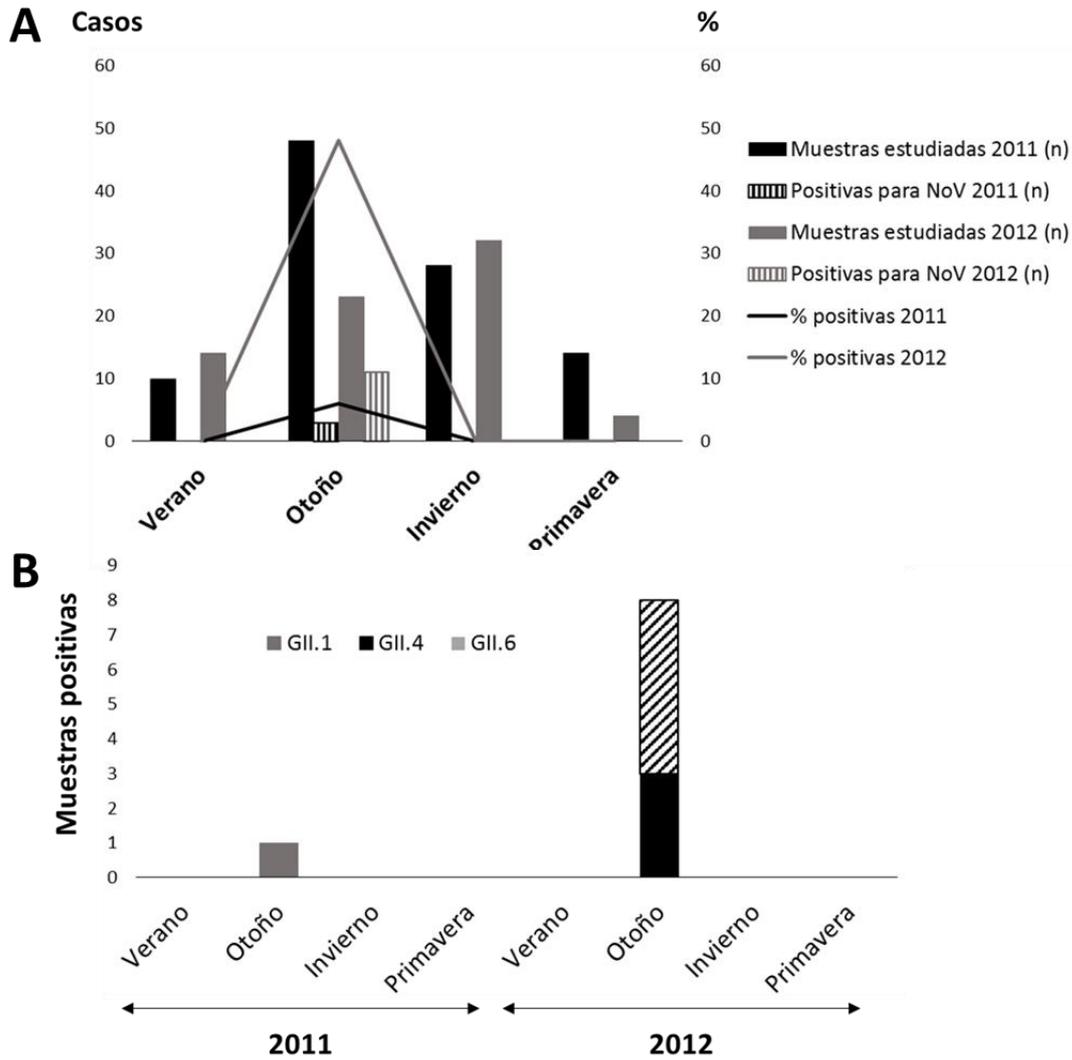
cepas GII.6c, y la cepa GII.6a, junto con cepas ambientales previamente detectadas en Uruguay; ii) 3 fueron clasificadas dentro del genotipo GII.4, variante *New Orleans 2009*, agrupando en un mismo *cluster* con cepas ambientales previamente detectadas en Uruguay (Figura 4.7.5, parte del medio); y iii) la restante perteneció al genotipo GII.1, agrupando también en un mismo *cluster* con cepas ambientales previamente detectadas en Uruguay (Figura 4.7.5, parte de abajo).

Todos los genotipos de NV-GII determinados por análisis filogenético en el presente estudio, fueron también comprobados mediante el uso de la herramienta bioinformática *Norovirus Genotyping Tool v1.0* (Kroneman et al., 2011) disponible *on-line* en: <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool> (Tabla 4.7.1).

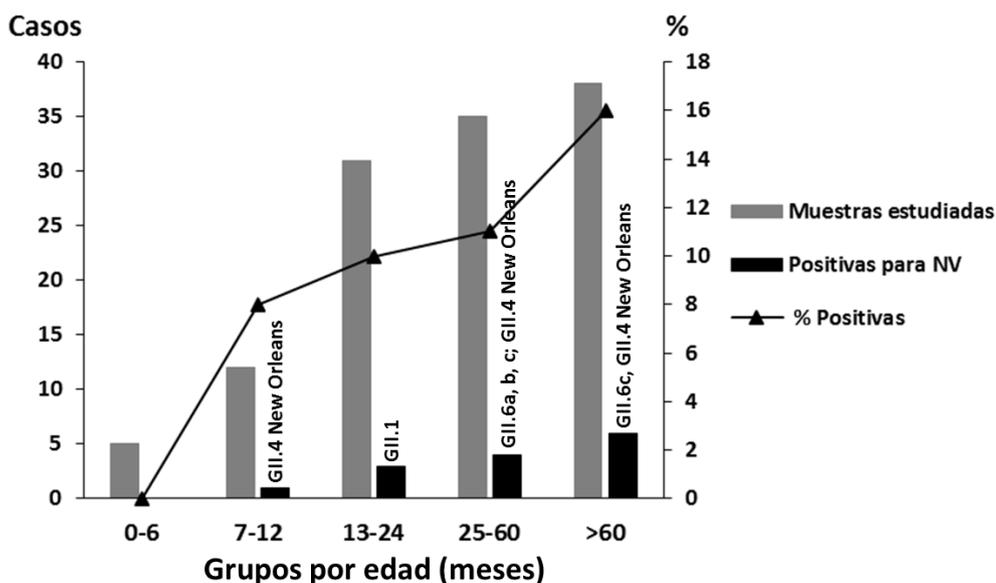
Fue observada la presencia de NV solamente durante la estación de otoño para los dos años de estudio y la mayoría de los casos positivos fueron observados durante el año 2012 (Figura 4.7.6A). Los genotipos detectados en otoño del 2012 fueron GII.4 y GII.6; en tanto, en otoño de 2011 solamente fue detectado el genotipo GII.1 (Figura 4.7.6B).

**Tabla 4.7.1 – Resultado del análisis realizado con la herramienta *Norovirus Genotyping Tool* de las cepas uruguayas de Norovirus GII detectadas a partir de las muestras clínicas de niños hospitalizados con GAI en Salto.**

Nombre cepa	Largo (pb)	Secuencia de referencia	Empieza en (pb)	Termina en (pb)	Genogrupo	Genotipo de ORF2	Variante de ORF2	Soporte genotipo	Soporte variante
235	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.6		100	
238	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.6		100	
238	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.6		100	
229	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.4	<i>New Orleans 2009</i>	100	91
228	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.6		100	
179	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.4	<i>New Orleans 2009</i>	100	91
178	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.4	<i>New Orleans 2009</i>	100	91
174	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.6		100	
65	344	U07611	5045	5389	NoV II	GII.1		98	



**Figura 4.7.6 – A)** Tasa de detección y estacionalidad de Norovirus humanos GI y GII (NV-GI y NV-GII) identificados por PCR en casos de GAI en Salto, durante dos años (enero de 2011 a diciembre de 2012). **B)** Distribución temporal de los genotipos de NV-GII detectados a partir de las muestras secuenciadas. Verano: 21 de diciembre a 20 de marzo; Otoño: 21 de marzo a 20 de junio; Invierno: 21 de Junio a 20 de setiembre; Primavera: 21 de setiembre a 20 de diciembre.



**Figura 4.7.8 – Distribución de las infecciones de astrovirus humanos (MAstV-1) por grupo etario en niños hospitalizados por GAI en Salto, Uruguay, durante 2 años consecutivos (enero del 2011 a diciembre 2012).** En cada grupo etario se muestran los genotipos/linajes detectados.

La edad de los pacientes infectados con NV fue de 10 meses a 25 años de edad. Siendo que la mayoría de los casos (92%), ocurrió en pacientes menores a 10 años de edad. El único paciente mayor a 10 años de edad en el que se detectó NV, correspondió a una mujer adulta de 25 años en la que NVGII fue detectado tanto en materia fecal como en vómito. Pero, lamentablemente estas muestras no pudieron ser secuenciadas. Se pudo observar un aumento en la positividad a medida que aumentaba la edad de los pacientes (Figura 4.7.8). Tomando en cuenta todos los grupos etarios, el grupo de pacientes mayores a 5 años fue el que presentó mayor positividad (43%), seguido del grupo de niños de entre 2 y 5 años (29%), el de niños de entre 1 y 2 años (21%), y el de bebés de entre 7 y 12 meses de edad (7%). No fueron observados casos positivos de NV en bebés de 0 a 6 meses de edad. Tomando en cuenta todos los grupos etarios, la mayor diversidad de cepas circulantes fue observada en el grupo etario comprendido en niños de entre 2 y 10 años de edad, siendo aún mayor en el grupo de niños de entre 2 y 5 años de edad (Figura 4.7.8).

## 4.7 – Anexos

### 4.7 – Anexo 1: TCLA

#### TÉRMINO DE CONSENTIMIENTO LIBRE Y ACLARADO

(Hoja para el PACIENTE)

El grupo de docentes del Laboratorio de Virología Molecular de la Regional Norte de la Universidad de la República, ubicado en la ciudad de Salto y dirigido por el Dr. Rodney Colina está desarrollando una investigación titulada “*Relevamiento del impacto de Rotavirus en pacientes pediátricos hospitalizados con gastroenteritis en Uruguay, país sin vacunación obligatoria contra este virus*”. El objetivo de este estudio es investigar la presencia del virus en niños hospitalizados con gastroenteritis (principalmente por diarrea y/o vomito). Los resultados serán mantenidos en confidencialidad y serán enviados al equipo médico que corresponda. El material analizado será colectado por profesionales de la salud por lo que esta investigación no presenta ningún riesgo a la salud del paciente. No habrá ningún tipo de costo para el paciente, ni para la Institución de Salud. Por cualquier consulta al respecto dirigirse al servicio correspondiente de la referida la Institución de Salud, o al teléfono 47334816, internos: 145 o 146, o 47342925, interno 102, ambos del Laboratorio de Virología Molecular en Salto (Centro Universitario Salto, CENUR del Litoral, UdelaR).

Investigador responsable \_\_\_\_\_  
Dr. Rodney Colina

Yo, \_\_\_\_\_, paciente/(responsable por el paciente \_\_\_\_\_) fui debidamente informado sobre la investigación “*Relevamiento del impacto de Rotavirus en pacientes pediátricos hospitalizados con gastroenteritis en Uruguay, país sin vacunación obligatoria contra este virus*” y estoy de acuerdo en participar/(de que el paciente participe).

Firma: \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_

#### TÉRMINO DE CONSENTIMIENTO LIBRE Y ACLARADO

(Hoja para el LABORATORIO)

El grupo de docentes del Laboratorio de Virología Molecular de la Regional Norte de la Universidad de la República, ubicado en la ciudad de Salto y dirigido por el Dr. Rodney Colina está desarrollando una investigación titulada “*Relevamiento del impacto de Rotavirus en pacientes pediátricos hospitalizados con gastroenteritis en Uruguay, país sin vacunación obligatoria contra este virus*”. El objetivo de este estudio es investigar la presencia del virus en niños hospitalizados con gastroenteritis (principalmente por diarrea y/o vomito). Los resultados serán mantenidos en confidencialidad y serán enviados al equipo médico que corresponda. El material analizado será colectado por profesionales de la salud por lo que esta investigación no presenta ningún riesgo a la salud del paciente. No habrá ningún tipo de costo para el paciente, ni para la Institución de Salud. Por cualquier consulta al respecto dirigirse al servicio correspondiente de la referida la Institución de Salud, o al teléfono 47334816, internos: 145 o 146, o 47342925, interno 102, ambos del Laboratorio de Virología Molecular en Salto (Centro Universitario Salto, CENUR del Litoral, UdelaR).

Investigador responsable \_\_\_\_\_  
Dr. Rodney Colina

Yo, \_\_\_\_\_, paciente/(responsable por el paciente \_\_\_\_\_) fui debidamente informado sobre la investigación “*Relevamiento del impacto de Rotavirus en pacientes pediátricos hospitalizados con gastroenteritis en Uruguay, país sin vacunación obligatoria contra este virus*” y estoy de acuerdo en participar/(de que el paciente participe).

Firma: \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_

4.7 – Anexo 2: Ficha epidemiológica del paciente

## FICHA EPIDEMIOLOGICA DEL PACIENTE (DIARREAS VIRALES)

 UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA	Lab. de Virología Molecular Centro Universitario Salto CENUR del Litoral Universidad de la República Salto	 Regional Norte	Dirección del Laboratorio de Virología Molecular: Salón 14, piso 0 Centro Universitario Salto, CENUR del Litoral, UdelaR Gral. Rivera, 1350 - CP 50.000 - Salto Tel: 473 34816, internos: 145 o 146 y 473 42924
Fecha de Registro en Virología: ___/___/___ <small>(llenado en el Lab. de Virología)</small>		N° de registro: _____ <small>(llenado en el Lab. de Virología)</small>	
UNIDAD: _____ Nombre para contacto en la Unidad: _____ Teléfono / fax: _____ e-mail: _____		N° de registro en la Unidad: _____ FECHA DE COLECTA: ___/___/___ <small>(llenado en la Unidad de Salud)</small>	
Muestra de paciente: <input type="checkbox"/> Internado      La muestra fue colectada hasta 24 hs de internado: <input type="checkbox"/> Ambulatorio <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Brote <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		¿Fue vacunado contra rotavirus? <input type="checkbox"/> Si Cual? _____ <input type="checkbox"/> No 1 <sup>era</sup> dosis:-- 2 <sup>da</sup> dosis:-- 3 <sup>era</sup> dosis:--	
<b>INFORMACIONES DEL PACIENTE</b>			
Nombre: _____ Edad: ___ años ___ meses      Grupo sanguíneo: _____      Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F Dirección (solo: barrio / ciudad, pueblo o villa / departamento): _____ Tipo de alimentación: <input type="checkbox"/> Solamente leche materna <input type="checkbox"/> leche materna + otros <input type="checkbox"/> Otros Posee mascota en casa? <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No    Cual? _____    Cuantos? _____			
<b>INFORMACIONES CLÍNICAS DEL PACIENTE</b>			
Muestra de Diarrea <input type="checkbox"/> o Vomito <input type="checkbox"/> Síntomas hace _____ días.    Fecha de inicio de los síntomas: ___/___/___			
Presencia de: <input type="checkbox"/> Moco (en las heces) <input type="checkbox"/> Sangre (en las heces) <input type="checkbox"/> Fiebre <input type="checkbox"/> Vomito <input type="checkbox"/> Dolor abdominal <input type="checkbox"/> Inapetencia <input type="checkbox"/> Rinitis <input type="checkbox"/> Tos <input type="checkbox"/> Rash cutáneo <input type="checkbox"/> Deshidratación <input type="checkbox"/> alteraciones neurológicas agudas <input type="checkbox"/> otros / cuales: _____			
Uso de antibióticos en el momento de la colecta? <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Cual? _____    Tiempo de uso: _____			
Condiciones Asociadas: <input type="checkbox"/> SIDA <input type="checkbox"/> otras / cuales: _____			
Tipo de tratamiento: <input type="checkbox"/> A (prevención de la deshidratación) <input type="checkbox"/> B ( re-hidratación oral ) <input type="checkbox"/> C (hidratación venosa)			
<b>PACIENTE INTERNADO</b>			
<input type="checkbox"/> Enfermería n° _____ <input type="checkbox"/> CTI <input type="checkbox"/> Aislamiento <input type="checkbox"/> Cirugía			
Motivo de la Internación: <input type="checkbox"/> Diarrea <input type="checkbox"/> Deshidratación <input type="checkbox"/> Otro / Cual: _____			
Inicio de la diarrea en el Hospital: <input type="checkbox"/> ≤ 72hs de internado <input type="checkbox"/> > 72hs de internado			
Observaciones: _____			

## 5 – DISCUSIÓN GENERAL GLOBALIZADORA

A partir de la realización del presente trabajo de tesis, ha sido posible detectar y caracterizar molecularmente tres virus entéricos humanos de gran importancia epidemiológica en casos de gastroenteritis aguda (GA), especialmente en niños menores a 5 años de edad (GA infantil o GAI). Estos tres virus son: los Rotavirus del Grupo A (RVA), los Norovirus humanos (NV) de los genogrupos I y II (NVGI y NVGII) y los Astrovirus humanos “clásicos”; estos últimos, actualmente denominados Mamastrovirus-1 (MAstV-1). La mayoría de las muertes por GA ocurren en países en vías de desarrollo y los RVA y NV son responsables de más de la mitad de ellas (Walker et al., 2013; Patel et al., 2008). Sumado a esto, los MAstV-1 han sido reportados como la segunda o primera causa de GA en niños de la misma franja etaria (De Benedictis, 2011; Bosch et al., 2014).

A nivel regional los tres virus han sido ampliamente estudiados a partir de GAI en casos esporádicos y brotes, así como en la comunidad y en hospitales. Brasil y Argentina son los países que se destacan como los que más han contribuido al conocimiento de la epidemiología y evolución de estos virus (Linhares et al., 2011; Fioretti et al., 2011). La mayoría de estos estudios se han realizado mediante la caracterización molecular de los mismos por medio de protocolos de RT-PCT, debido a que esta metodología es la más ampliamente utilizada por su gran sensibilidad, especificidad y reproductibilidad, lo que ha sido documentado para los tres virus en diversos trabajos publicados (WHO, 2009; Bosch et al., 2014; Vinjé, 2015).

En el caso de Uruguay, hasta el momento de realización de esta tesis, se desconocía la incidencia de los NV y MAstV-1 en casos de GAI a nivel nacional. Solamente se conocía la incidencia de RVA en los casos de GAI, pero estos estudios fueron todos realizados (con la excepción de un único trabajo) en la capital del país. La mayoría de ellos fueron publicados en revistas científicas nacionales (Hortal et al., 1986; Ribeiro et al., 1999; Ramirez et al., 2001; Torres et al., 2001; De Sierra et al., 2002; Berois et al., 2003; Delfino et al., 2006; Pérez et al., 2007; 2011; Viettro et al., 2009). Esto implica que hasta hace muy poco tiempo, se desconocía la incidencia de éstos en los casos de GAI que ocurren en el interior del país. Además, solamente en uno de estos trabajos fue realizado un estudio de epidemiología molecular, en el cual se determinaron los genotipos G, pero no los genotipos P, de RVA de muestras de 1996 a 1999 (Berois et al., 2003). Por ambos motivos y debido a que nuestro grupo se constituye en el primer laboratorio de virología radicado en el interior del país, nos

hemos planteado como principal objetivo comenzar a investigar la incidencia de diversas enfermedades que afectan a la población del interior (y a la de todo el país), y que en su amplia mayoría nunca han sido investigadas fuera de los límites del departamento de Montevideo. Entre esas enfermedades, las GAI de etiología viral representan un importante problema de salud en la población pediátrica. En este sentido, a través del desarrollo de esta tesis, hemos podido contribuir al estado actual del conocimiento con la obtención de los primeros datos de esta enfermedad en distintas regiones geográficas del Uruguay.

Por otro lado, en el marco de dichas investigaciones, se logró publicar el primer trabajo de virología ambiental realizado en Uruguay (Artículo 1). En este estudio fue relatado por primer a vez a nivel nacional la presencia de RVA, NV (GI y GII) y MAstV-1. El citado artículo describe la prevalencia, caracterización y cuantificación por RT-PCR de estos tres virus a partir de aguas residuales, en una amplia región geográfica que a su vez es limítrofe con Argentina.

La vigilancia ambiental de virus entéricos humanos a partir del estudio de las aguas residuales en conjunto con los estudios de vigilancia a nivel clínico, fortalecen los resultados epidemiológicos que se obtienen. Esto ha sido descrito en el Artículo 4 de esta tesis y además, ha sido relatado para estos tres virus en otros estudios (Nadan et al., 2003; Hellmér et al. 2014; Ruggeri et al., 2015).

La importancia de ello radica en dos cuestiones fundamentales: por un lado y principalmente, a que en las aguas residuales urbanas no solo se detectan los virus que circulan en los casos clínicos con GA que requieren asistencia médica (que son las muestras clínicas a las que accedemos); y en segundo lugar, se logra obtener un panorama más completo de los virus que circulan en toda la población, detectándose además: i) los casos de GA moderada o leve que no requieren asistencia médica; ii) los casos de GA en individuos adolescentes mayores a 15 años de edad hasta adultos menores a 65 años de edad que generalmente no requieren asistencia médica; iii) los casos de individuos de todas las edades que aún no han comenzado a manifestar los síntomas, o, que ya se enfermaron y resolvieron su cuadro clínico, pero que, aun así, en ambos casos secretan el virus en sus heces (algunos por períodos muy prolongados, como se ha relatado para NV); y iv) los casos asintomáticos que en estos tres virus suelen ser muy frecuentes (Bosch et al., 2008; 2014; karst, 2010; Estes & Greenberg, 2013).

Sin embargo, en el caso de Uruguay, como ocurre también para otros países, no existe una red de vigilancia de estos virus a nivel nacional mediante convenios formales entre laboratorios de virología de las universidades con el Ministerio de Salud Pública, e instituciones de salud privadas, que posibiliten el estudio en todas las regiones del país de forma continua de los casos de GAI.

Esto obstaculiza frecuentemente la obtención de las muestras clínicas, y deja a los investigadores universitarios condicionados a la buena voluntad y motivación de los médicos y el personal de salud para que realicen la colecta de las mismas por fuera de sus obligaciones laborales. De esta forma, tal como ocurrió durante el transcurso de este trabajo de tesis, de las seis ciudades analizadas, solamente se ha podido obtener muestras clínicas de una de las ciudades seleccionadas, si bien se intentó variar veces mediante la visitas y seminarios dirigidos al personal de salud de todas las ciudades implicadas, el poder coleccionar muestras, pero lamentablemente eso no fue posible. Por esta razón, el estudio de las muestras ambientales ha debido convertirse en la única alternativa y a la vez en una poderosa herramienta de obtención de datos epidemiológicos de estos virus en las poblaciones de las otras cinco ciudades. Cabe resaltar en este sentido, que la caracterización molecular de los tres virus a partir de muestras ambientales proporcionó importantes datos epidemiológicos de los tres virus. Ello destaca que este tipo de estudios epidemiológicos de virología ambiental pueden ser realizados como alternativa a estudios clínicos (ante la imposibilidad de acceder a este tipo de muestras) ya que son un reflejo de las cepas virales que circulan en las población (Artículos 3 y 4).

### **5.1 – Estudio epidemiológico prospectivo y descriptivo basado en análisis moleculares de RVA, NV y MAstV-1 en pacientes pediátricos hospitalizados con GAI en la ciudad de Salto**

La ciudad de Salto es la segunda ciudad en densidad de población a nivel nacional luego de Montevideo, lo que la convierte en la ciudad más poblada del interior del país (INE, 2011). Salto, además, es la principal ciudad de lo que se denomina el “Litoral Termal” de Uruguay, siendo éste el tercer destino a nivel nacional (luego de Montevideo y Punta de Este) que recibe turistas extranjeros que ingresan al país, según estadísticas realizadas de 2004 a 2014 (Ministerio de Turismo, 2015). Por otro lado, Salto está ubicada al Norte del país en extremos geográficos opuestos con Montevideo, limítrofe con Argentina y muy cercana a la frontera con Brasil. Estas características

convierten a la ciudad de Salto en una región geográfica de sumo interés para la realización de estudios epidemiológicos de diversas enfermedades infecciosas que puedan ingresar al país, entre ellas las GAI de etiología viral.

Sumado a esto, Salto es el principal destino de “Turismo Termal”, no solamente para extranjeros que provienen sobre todo de los vecinos países de Brasil y Argentina, sino además para todos los uruguayos. Este Turismo termal se debe al gran desarrollo que presenta el departamento en cuanto a parques termales, hotelería y ofertas gastronómicas (Ministerio de Turismo, 2015). En este sentido, existen reportes a nivel internacional de brotes de GA de etiología viral de transmisión hídrica a través de actividades recreacionales en parques de aguas termales (Sinclair et al., 2009). Lo que convierte a Salto en una ciudad aún más interesante para el estudio de RVA, NV y MAstV-1, ya que los tres son virus entéricos humanos de transmisión hídrica (Metcalf et al., 1995; Bosch et al., 1998; 2008).

Debido a esto, en el marco del presente trabajo, se ha realizado un estudio epidemiológico prospectivo y descriptivo durante dos años completos en la ciudad de Salto (de enero del 2011 a diciembre del 2012), en el que se ha investigado la presencia de estos tres virus en casos de GAI en pacientes hospitalizados.

Para la realización del presente trabajo y atendiendo a lo señalado en párrafos anteriores, se han constatado algunas dificultades que se entiende necesario señalar:

1- Al inicio del desarrollo del proyecto que derivó en esta tesis, se ha establecido contacto con el personal médico y autoridades de los hospitales y mutualistas de otras ciudades del interior del Uruguay: Melo, Río Branco, Treinta y Tres, Tacuarembó, Paso de los Toros y Paysandú. En una primera etapa del proyecto se han realizado visitas a diferentes instituciones de salud en cada una de las ciudades mencionadas para mantener reuniones con el personal de salud e informarles, mediante una presentación oral, la relevancia del proyecto a efectos de obtener alianzas. En esas reuniones se les ha acercado información impresa del proyecto y también recipientes de plástico para la colecta de muestras clínicas. Los médicos y autoridades de los centros de salud de todas las ciudades visitadas demostraron su interés en llevar a cabo el proyecto en colaboración con nuestro grupo (mediante la colecta y envío de las muestras a Salto) y reconocieron su relevancia. Sin embargo, nunca han enviado muestras clínicas aún cuando se han establecido contactos posteriores con ellos, por parte del grupo de investigación, por vía telefónica y correo electrónico. Es de destacar a su vez que todos los costos económicos corrían por parte de nuestro grupo de investigación y aun así

jamás fueron reportadas muestras clínicas, cuando de acuerdo a diversos informes (a los cuales accedimos) la GAI constituía un serio problema de salud en cada ciudad visitada.

2- Otra dificultad enfrentada, ha sido la de mantener una colecta continua de muestras clínicas en Salto. A partir de inicios del 2013 hasta la fecha, el envío de muestras al Laboratorio ha mermado mucho. Se han recibido unas pocas muestras, y con intervalos de tiempo muy largos entre una muestra y la siguiente. Por esta razón se ha decidido cerrar el muestreo a dos años completos (2011 a 2012) en los que los envíos han sido de forma relativamente continua durante todo el año, lo que ha permitido un estudio epidemiológico más exhaustivo.

A partir del estudio de esas muestras para el intervalo asumido, se pudo determinar en primera instancia que el virus más prevalente fue RVA (37%), seguido de MAstV (10,3%) y NV (8%). Esta prevalencia observada para los tres virus, coincide con la prevalencia que se observa a nivel mundial, donde RVA sigue siendo el virus más detectado en los casos GAI severa que requieren hospitalización, sobre todo en países en vías de desarrollo sin vacunación para el virus, como es el caso de Uruguay (Kotloff et al., 2013; Platts-Mills et al., 2015).

### **5.1.1 – Distribución de las infecciones por grupo etario**

Al considerar la distribución de las infecciones de RVA, NV y MAstV-1 por grupo etario fue observado en primera instancia que la mayoría de los casos ocurrió en niños menores de 5 años de edad. Se observó que el 75%, 67% y 57% de los casos positivos para RVA, MAstV-1 y NV, respectivamente, pertenecen a ese grupo etario en el que se detectó además, la mayor diversidad de cepas circulantes. En este sentido, la mayor positividad y diversidad de cepas circulantes observada en niños menores de 5 años concuerda con lo esperado para los tres virus, ya que es en este grupo etario donde ocurren generalmente la mayoría de los casos de GAI, y sobre todo aquellos más graves que requieren hospitalización (Estes & Greenberg, 2013; Green, 2013; Mendes & Arias, 2013).

Por otro lado, en niños menores de un año de edad se ha constatado dos aspectos: o bien no fue observada la presencia de virus (como en el caso de NV y MAstV-1 para bebés menores a 6 meses), o bien se observaron muy pocos casos (como en el caso de RVA) con una menor diversidad de cepas circulantes. Entre las posibles razones de estas constataciones se señala que podría deberse a que los bebés hasta el año de edad se encuentran en casa de los padres o tutores bajo el cuidado permanente de

los mismos, amamantando y resguardados del contacto con otros bebés, ya que generalmente en esa edad, no concurren a guarderías infantiles. Esto último, limitaría la transmisión del virus de un niño a otro, así como de adultos hacia él. Y en el caso del amamantamiento, son ampliamente conocidos los beneficios hacia el niño para protegerlo de GAI de etiología viral y GAI de forma general, entre otras cosas, por la transmisión, por parte de la madre de anticuerpos protectores contra estos virus a través de la leche materna (Brown et al., 2009; Lamberti et al., 2011; Estes & Greenberg, 2013).

Por último, cabe destacar que también se han recibido algunas muestras clínicas de pacientes adultos, generalmente de particulares, que fueron positivas para NV y MAstV-1, y negativas para RVA. A pesar de que estos tres virus han sido detectados en casos de GA en adultos, esta es más común para NV y también MAstV-1, debido a su fuerte asociación con brotes de transmisión hídrica y a través de alimentos, en individuos de esta franja etaria (Munula et al., 2004; Bosch et al., 2008; Patel et al., 2009; Breese et al., 2012).

### **5.1.2 – Distribución temporal de las infecciones**

Durante los dos años de estudio ha sido constatado un patrón de circulación temporal diferente para los tres virus. En el caso de RVA se observó un patrón de estacionalidad marcado con picos de detección en invierno en los dos años, consecutivamente. Ello concuerda con lo relatado para las infecciones por RVA en países de clima templado como Uruguay (Cook et al., 1990; Kane et al., 2004; Chandran et al., 2010). En el caso de NV, éstos fueron observados solamente durante la estación de otoño en los dos años de estudio, aunque fueron notoriamente más prevalentes durante otoño del 2012. Al igual que NV, los MAstV-1 también fueron observados principalmente durante la estación de otoño, pero al contrario que los NV, fueron notoriamente más prevalentes en otoño del 2011. En el caso de MAstV-1, también fueron observados casos positivos en verano e invierno de 2011; sin embargo, su prevalencia en otoño de ese año fue mucho mayor. Al igual que para RVA, se ha descrito un patrón de estacionalidad con picos en invierno para NV y MAstV-1 en países de clima templado, lo que algunos autores asocian a la estabilidad que presentan las partículas virales a bajas temperaturas (Abad et al. 1997, 2001), y a que en climas fríos las personas tienden a estar más aglomeradas en lugares cerrados, lo que facilitaría la transmisión persona-a-persona (Patel et al., 2009; Matthews et al., 2012; Bosch et al

2014). Pero en el caso de NV y MAstV, el hecho de que hayan sido detectados más en otoño que en invierno, podría explicarse debido a que en esa estación es que inicia el año escolar (incluyendo jardín de infantes) en donde se aglomeran muchos niños en un local cerrado como la escuela, aumentando así el riesgo de que ocurran brotes en esas instituciones como ya ha sido relatado, sobre todo para NV (Götz et al., 2002; Gallimore et al., 2004; Akihara et al., 2005; CDC, 2009; Kimura et al., 2012), aunque también para MAstV-1 (Oishi et al., 1994).

### **5.1.3 – Detección de RVA y NV en muestras de vómito**

Uno de los aportes más interesantes y particulares, a nuestro entender, del desarrollo de este trabajo de tesis, fue la posibilidad de acceder a muestras de vómito de pacientes con GA, y la detección de RVA y NV a partir de las mismas, no siendo detectados los MAstV-1.

En primera instancia, fue observada una positividad mayor en las muestras de vómito que en las de materia fecal, para RVA (41% y 36%, respectivamente) y NV (18% y 6,5%, respectivamente). Ello permite afirmar que, de acuerdo con nuestros datos, este síntoma está más fuertemente asociado a una infección viral con RVA o NV que la diarrea en sí. De las veintidós muestras de vómito analizadas, tres de ellas fueron colectadas junto con una muestra de materia fecal del mismo paciente, en tanto las restantes diecinueve fueron de pacientes cuyo único síntoma clínico fue el vómito. Cabe resaltar, de acuerdo a nuestros resultados, la importancia de poder acceder a muestras de vómito cuando éste es el único síntoma, para no subestimar la incidencia de las GAI por RVA y NV.

Otro dato interesante fue que los tres individuos de los que se colectó materia fecal y vómito fueron positivos en ambas muestras para uno de estos virus; dos de ellos fueron positivos para RVA, y el tercero para NV, en ambas muestras. En el caso del paciente de NV se trató de un individuo adulto, pero lamentablemente no se pudo secuenciar NV de ninguna de las dos muestras (materia fecal y vómito). Este resultado resalta, además de la importancia de coleccionar ambas muestras en un paciente que está manifestando los dos síntomas, la elevada prevalencia de estos virus en pacientes con ambas sintomatologías (100% en nuestro caso).

Hasta donde se conoce, solo hay dos trabajos publicados en la literatura internacional, en los que se describe la detección de RVA a partir de muestras de vómito (Youngs & Pugh, 1989; Cotterill et al., 1988). Youngs y Pugh (1989) relatan un brote

de GA con su vía de transmisión más frecuente de persona-a-persona y sugieren que el vómito, con el inevitable acompañamiento de los aerosoles que se generan durante el mismo, podría ser una vía de transmisión de RVA. En un estudio reciente Hagbom y colaboradores (2011) describen una posible vía por la cual la infección con RVA y también NSP4 por sí sola, serían capaces de estimular regiones del sistema nervioso central relacionadas a la inducción de náuseas y vómito. Este proceso podría ser el responsable de la asociación ampliamente documentada de la infección con RVA y la generación de vómito (Estes & Greenberg, 2013). A pesar de estos dos estudios que relatan la detección de RVA en vómito, publicados a finales de 1980, y la reciente descripción del posible mecanismo por el cual este virus induciría vómito en pacientes infectados, no se ha reportado ningún otro estudio relatando la detección de RVA en vómito hasta el momento. Además, la generación de aerosoles (conteniendo partículas virales en sus gotículas) que se generan en un episodio de vómito, no es actualmente considerada una vía de transmisión de los RVA (Estes & Greenberg, 2013).

Por otro lado, en el caso de NV, muchos estudios epidemiológicos han asociado la exposición a partículas de este virus que se encuentran en gotículas de aerosoles que comúnmente se generan durante un evento de vómito, a brotes de GA (Green, 2013). Por otra parte, este virus ha sido detectado: i) en vómito obtenido de voluntarios infectados (Greenberg et al., 1979); ii) en buches bucales de individuos infectados con NV por varios días luego de que los síntomas remitieron, sugiriendo que la ruta de transmisión oral-a-oral puede ocurrir en NV (Kirby et al., 2010); y iii) recientemente, al igual que lo que se describe en esta tesis, Kirby y colaboradores (2011) detectaron NV en muestras de vómito de pacientes que presentaron vómito como el púnico síntoma, y debido a eso, un aumento en el número de casos de NV fue observado mediante la colecta y análisis de muestras de vómito.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el vómito es actualmente considerado como una vía de transmisión de NV en ciertos entornos (Green, 2013). Muy recientemente, un trabajo publicado por Tung-Thompson y colaboradores (2015), demostró que los NV pueden ser transmitidos por vía aérea en gotículas generadas durante el vómito. Para demostrarlo, estos autores utilizaron un “virus sustituto” de NV (norovirus surrogate), el bacteriófago MS2, que es cultivable en *E. coli*; y construyeron una “máquina de vomitar”. Esta última, consiste en una máquina que simula el sistema digestivo humano a una escala 4 veces menor y que es capaz de simular un vómito. El MS2 fue cargado en el “estómago” de la máquina, y luego se hizo “vomitar” a la

máquina en un ambiente cerrado en el que se colocó SKC Biosampler® (un mestreador de bioaerosoles). El MS2 fue detectado en gotículas generadas en el vómito, que se transmiten por el aire, mediante el análisis de las muestras colectadas por el SKC Biosampler®.

#### **5.1.4 – Caracterización molecular**

A partir de los casos positivos se pudo realizar la secuenciación y caracterización molecular por análisis filogenético de las distintas cepas de RVA, NVGII y MAstV, en 66%, 64% y 78%, respectivamente, de las muestras positivas por RT-PCR. De forma general, fue observada una gran diversidad genética con diferentes genotipos, linajes, sublinajes y variantes detectadas, lo que está en concordancia con datos previamente publicados en la región y el mundo.

##### **5.1.4.1 – RVA**

Tal como se describe en la sección 4.3, fue detectada una gran diversidad de genotipos comunes en humanos, así como el genotipo emergente G12 (en asociación con P[8] y P[9]), lo que significó la primera detección de este último en el país. El artículo 3, representa el primer trabajo de caracterización molecular determinado genotipos G y P de RVA en el país, en concordancia con las actuales recomendaciones de la OMS para la realización de estudios de epidemiología molecular en este virus (WHO, 2009). Recientemente, se ha observado un aumento del G12P[8] en Brasil, siendo inclusive reportado como el genotipo más prevalente en algunas regiones del vecino país (Neves et al., 2015; Luchs et al., 2015). Los genotipos más frecuentemente detectados fueron el G2P[4] y el G3P[8]. Fue observado un fenómeno de sustitución de un genotipo prevalente de un año al siguiente. En este sentido, el genotipo G2P[4], que fue prevalente durante el año 2011, no fue más detectado durante el año 2012 pasando a ser el genotipo G3P[8] el prevalente en el segundo año. Este fenómeno de sustitución estacional de una cepa de RVA por otra en intervalos de tiempo cortos, ha sido propuesto como un mecanismo de persistencia de este virus en la población (Parra, 2009). El aumento observado del genotipo G2P[4] en concordancia con la introducción de la vacuna RV1 en Sudamérica y otras partes del mundo, ha levantado sospechas sobre un fenómeno de presión selectiva por parte de la vacuna (ya que este genotipo es totalmente diferente al de la vacuna), aunque también se plantea la posibilidad de un fenómeno de fluctuación natural del mismo (Esteban, 2010; Martínez et al., 2010;

Carvalho-Costa et al., 2011; Matthijnsens & Van Ranst, 2012; Gómez et al., 2014). Esta última hipótesis está respaldada por el aumento en la prevalencia del mismo en países donde no se ha incorporado la RV1, como es el caso de Uruguay. En este sentido, nuestros resultados estarían en concordancia con la segunda hipótesis, ya que el mismo no fue detectado en el año 2012. Más recientemente, algunos trabajos proponen que la presión selectiva ejercida por la vacunación en otros países de Sudamérica, sobre todo de Brasil por representar la mitad de la población de América del Sur, podría estar generando un cambio en la circulación de genotipos en los países vecinos que no poseen vacunación (Matthijnsens et al., 2012; Mandile et al., 2014). En la actualidad, con la gran cantidad de países vacunados en Sudamérica (PATH, 2015), más estudios son necesarios, sobre todo en países no vacunados, para poder conocer más al respecto de este fenómeno.

#### **5.1.4.2 – NV**

##### **5.1.4.2a – Análisis de recombinantes en NV**

Luego del análisis de las muestras correspondientes al primer año de muestreo, Fajardo A y Tort LFL, seleccionaron seis muestras positivas por un protocolo direccionado a la región B de NV, tres de materia fecal y tres de vómito, detectadas durante este período, y que fueron llevadas al Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental (LVCA), del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro, Brasil (FIOCRUZ, RJ), a inicios del 2013 por ambos estudiantes. Estos intercambios fueron realizados en la modalidad de doctorado sándwich en el marco de un proyecto de colaboración internacional entre ambos laboratorios (FIOCRUZ y Salto) (Proyecto CAPES/MERCOSUR). Una vez en el LVCA, los estudiantes analizaron estas muestras en busca de cepas recombinantes mediante la colaboración del Dr. Fumian, investigador del LVCA, quien recientemente había publicado un artículo al respecto (Fumian et al., 2012). Mediante la utilización del protocolo de Fumian y colaboradores (2012), fue posible determinar la presencia de NV recombinantes en 4 de las 6 muestras analizadas (Artículo 2), ocurriendo dicho evento de recombinación en la región de solapamiento del ORF1 con el ORF2, en concordancia con la elevada prevalencia de este tipo de eventos en NV según los que se describe en la literatura internacional (Katayama et al., 2002, 2004; Han et al., 2004; Oliver et al. 2004; Bull et al., 2005; 2007; Fumian et al., 2012). El NV recombinante detectado en este estudio fue el GII.P7-GII.6, representando

la primer detección de este recombinante en América Latina, y el segundo reporte a nivel mundial (Huynen et al., 2013).

#### **5.1.4.2b – Epidemiología molecular de NV**

Luego de finalizado el muestreo de los dos años, y finalizados los análisis de estas muestras para los tres virus, fue posible determinar la presencia de más muestras positivas para NV. El protocolo de detección direccionado a la región B del ORF1 previamente utilizado, fue sustituido por el protocolo de Kitajima y colaboradores (2010), que está direccionado a la región D del ORF2. Este cambio fue realizado debido a la gran sensibilidad y versatilidad de este método reportadas por los autores, ya que éste puede ser utilizado como método sensible de screening, a la vez que tiene una muy buena sensibilidad para futuros análisis de caracterización molecular de las cepas. La baja prevalencia inicial observada mediante el protocolo de la región B, llevó a que este virus fuera el último de los tres en ser analizado en el marco de esta tesis ya que involucraba reanalizar todas las muestras clínicas por la nueva metodología de Kitajima y col. (2010), lo que ha sido realizado el durante el último año.

Fueron detectados tres genotipos diferentes circulando en las muestras analizadas, de los cuales el genotipo GII.6 fue el más frecuente (56%), donde se pudo observar que las cepas detectadas agruparon en los tres cluster (a, b y c) recientemente descritos para el mismo (Vinjé, 2015). Luego le siguió en frecuencia el genotipo GII.4 (33%) y, por último, el genotipo GII.1 (11%). Cabe destacar que aún no se ha realizado el análisis de las cepas del genotipo GII.6 para saber si son efectivamente GII.6 o posibles recombinantes GII.P7-GII.6 como las anteriormente descritas en el Artículo 2. Ésta se constituye en una de las principales perspectivas de la presente tesis doctoral, por lo cual ya fueron encomendados los cebadores de NV de acuerdo al protocolo descrito por Fumian y colaboradores (2012). La presencia de GII.6 en las muestras analizadas en el presente estudio está de acuerdo con reportes recientes sobre la distribución global de este genotipo (Tran et al., 2013). Sin embargo, al contrario de lo reportado por Tran y col. (2013), este fue el genotipo más detectado en las muestras que se han podido secuenciar. De todas formas, pocas muestras pudieron ser secuenciadas en el presente trabajo, por lo que sería conveniente considerar que más muestras deberían ser analizadas en el futuro para determinar si efectivamente este genotipo es el más prevalente en nuestra región. Por otro lado, solamente una muestra fue detectada

como positiva para el genotipo GII.1, lo que concuerda con lo reportado por Tran y col. (2013), en donde este genotipo solo fue detectado en el 0,4% de los estudios revisados.

Un aspecto interesante se relaciona al hecho de que fue detectada la cepa pandémica GII.4 New Orleans 2009 durante el primer semestre de 2012. A diferencia de los otros dos genotipos detectados, la GII.4 New Orleans 2009 fue detectada en casi todos los grupos etarios. Ya ha sido ampliamente mencionado en este trabajo la importancia de este genotipo y sus variantes pandémicas, las que surgen cada cierto intervalo de tiempo, asociándose a su surgimiento un aumento en el número de brotes de NV (Siebenga et al., 2009; Tran et al., 2013; Ramani et al., 2014; Fioretti et al., 2014). En este estudio, los GII.4 fueron todos detectados en el período acotado comprendido entre marzo y abril del 2012, por lo que podría estar asociado con un brote. Sin embargo, pocas muestras fueron positivas para NV de forma general, como para poder determinar si se trató de un brote o de casos esporádicos.

#### **5.1.4.3 – MAstV-1**

Fue observada una gran diversidad genética MAstV-1 a partir de las muestras analizadas en el presente estudio, siendo el genotipo 1 el más frecuente (43%), seguido del HAstV-2 y HAstV-3 que fueron detectados con la misma frecuencia (29%). Las cepas de HAstV-1, fueron todas clasificadas dentro del linaje a (HAstV-1a), en concordancia con datos previamente observados por nuestro grupo de investigación en un estudio realizado a partir de aguas residuales del interior de Uruguay (Lizasoain et al., 2015 – Anexo 1). En ese estudio, al igual que en el presente estudio, el HAstV-1a fue el más frecuentemente detectado, y se observó su circulación durante todo el año 2011. En este sentido, en el presente estudio, a pesar de que la mayoría de los casos observados fueron detectados en otoño de 2011, el HAstV-1 fue el único genotipo que fue detectado también en 2012, y dentro del año 2011, fue detectado también en verano. Estos datos de la mayor prevalencia y frecuencia de detección en el tiempo, observada para HAstV-1, concuerdan con lo reportado en la región y el mundo (Gaggero et al., 1998; Medina et al., 2000; Giordano et al., 2001; Walter et al., 2001; Espul et al., 2004; Victoria et al., 2007; Resque et al., 2007; Mendes & Arias, 2013; Xavier et al., 2015).

Por otro lado, el HAstV-2c observado en el presente estudio se corresponde con los previamente observado por nuestro grupo de investigación a partir de muestras ambientales, en donde este genotipo fue solamente observado en la ciudad de Salto, de las seis ciudades analizadas del interior de Uruguay (Lizasoain et al., 2015 – Anexo 1).

En el presente estudio, fue detectado en una alta prevalencia el genotipo HAstV-3, lo cual coincide con reportes previos en América Latina en los que este genotipo ha sido observado en segundo o tercer lugar en cuanto a prevalencia, luego del HAstV-1 (Walter et al., 2001; Espul et al., 2004; Méndez-Toss et al., 2004). Más recientemente, este genotipo ha sido reportado como el más prevalente en la región Noreste de Brasil, en un estudio realizado en el período del año 2005 al 2011 (Xavier et al., 2015). En nuestro estudio, fue utilizada la clasificación que proponen Martella y colaboradores (2014), en la cual los autores, basados en el análisis del ORF2 completo, han descrito dos linajes (a y b) dentro del HAstV-3. De manera interesante, en análisis realizado en el presente trabajo, nuestras cepas agruparon por fuera de los linajes descritos (HAstV-3a y -3b) formando un cluster independiente, siendo muy similares a cepas de este genotipo descritas recientemente en Brasil (Xavier et al., 2015). En base a los valores de identidad nucleotídica descritos por estos autores para definir linajes dentro de este genotipo, nuestras cepas parecerían conformar un nuevo linaje dentro del HAstV-3. De todas formas, en la clasificación propuesta por Martella y col. (2015), a pesar de que la misma ha sido descrita como coincidente con la clasificación en genotipos y linajes basada en la región C, los autores reportan algunas excepciones con inconsistencias entre ambos sistemas de clasificación. Por lo tanto, nuestras cepas de HAstV-3, podrían estar dentro de esas inconsistencias excepcionales entre los dos sistemas de clasificación. En este sentido, una de nuestras perspectivas es secuenciar el ORF2 completo de nuestras cepas para confirmar si las mismas efectivamente forman un nuevo linaje dentro del HAstV-3. Por último, cabe destacar que ese genotipo no fue detectado en las muestras ambientales previamente analizadas por nuestro grupo (Lizasoain et al., 2015 – Anexo 1), por lo que es posible suponer que este genotipo estaría fuertemente asociado a hospitalizaciones de GA provocados por MAstV-1. Ello se debería a que los MAstV-1 han sido reportados como de menor frecuencia en niños hospitalizados que en casos esporádicos detectados en la comunidad, y estos últimos representarían el componente principal de cepas que se han detectado en las muestras ambientales (Gaggero et al., 1998; Ratcliff et al., 2002; Jakab et al., 2004). Más estudios de vigilancia epidemiológica en Salto, durante un período mayor, deberán ser realizados en el futuro próximo para dirimir esta cuestión.

## **5.2 – Investigación de RVA y NV a partir de aguas residuales de 6 ciudades del interior de Uruguay**

A partir del desarrollo de la presente tesis, tal como ya ha sido mencionado, fue realizado el primer trabajo publicado en el área de la Virología Ambiental en el país (Artículo 1). Este estudio fue el primer abordaje dentro de esta área que se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología de Salto, y en el que se colectaron de manera quincenal y durante un año completo, muestras de agua residual en cuatro ciudades ubicadas en el Litoral Noroeste del país: Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos. En cada ciudad se ha escogido un único punto de muestreo. Estas cuatro ciudades vuelcan sus aguas residuales al Río Uruguay que utilizan como cuerpo receptor de las mismas. Solamente una de ellas, Bella Unión, la menor en número de habitantes de las cuatro, realiza un tratamiento previo de las mismas. Cabe resaltar que este río nace aproximadamente 1200 kilómetros de la frontera con Brasil, y en sus aproximadamente 600 km que bordea Uruguay oficia de límite geográfico entre Uruguay y Argentina. De esta forma, el Río Uruguay (así como sus afluentes de ambos países, alguno de ellos, ríos de importante cauce como el Río Negro, Río Daymán y Río Arapey, por el lado uruguayo), es utilizado como cuerpo receptor de aguas residuales por parte de ciudades uruguayas y argentinas linderas (como ocurre para las cuatro ciudades del litoral Noroeste), así como también es utilizado para navegación, riego de praderas y cultivos, actividades recreacionales (pesca, playas y deportes acuáticos) y para toma de agua para consumo humano (C.A.R.U., 2015). Debido a esto, resulta de suma importancia determinar los virus presentes en las aguas residuales que utilizan el Río Uruguay como cuerpo receptor de las mismas. En el artículo 1 fueron detectados y cuantificados los tres virus mediante RT-PCR a tiempo final y RT-PCR en tiempo real, respectivamente y se han obtenido datos referentes a la caracterización molecular parcial, carga viral, prevalencia por ciudad y estacionalidad general de los tres virus.

Actualmente, se han descrito diferentes métodos para realizar la concentración viral a partir de muestras ambientales obtenidas de diferentes matrices acuáticas, estos son: i) Ultracentrifugación, ii) Ultrafiltración, iii) Precipitación (por diferentes métodos que utilizan: floculación orgánica, polientilenglicol y sulfato de amonio), iv) Adsorción-elución (utilizando membranas cargadas negativamente o positivamente, así como lana de vidrio), v) Liofilización, y vi) Perlas magnéticas (Bosch et al., 2008). La elección del método de concentración viral principalmente depende de qué matriz acuática se esté analizando, siendo el método de Ultracentrifugación uno de los más utilizados y

recomendados para aguas residuales (Bosch et al., 2008; Nordgren et al., 2009; Fumian et al., 2010; Prata et al., 2012). Uno de los principales problemas de los métodos de concentración viral a partir de muestras ambientales, y sobre todo aquellas con una carga de contaminantes elevada como lo son las aguas residuales, es la presencia de compuestos químicos en la muestra que puedan interferir con los resultados al inhibir las técnicas moleculares utilizadas luego para la detección viral, y de esta forma, generar resultados falso negativos. Muchos de estos inhibidores son comúnmente concentrados junto con los virus en estos métodos, por lo que se recomienda la utilización de un control interno para evitar resultados falsos negativos. El control interno generalmente está relacionado a un virus (lo ideal es que sea un virus que generalmente no esté presente en la muestra a analizar, sobre todo por los ensayos posteriores de cuantificación por PCR en tiempo real del mismo), que sea fácil de obtener y crecer en medio de cultivo, y que presente características fisicoquímicas y morfológicas similares a la de los virus que se están investigando. Este virus control, es inoculado en la muestra antes de realizar la concentración viral y es luego detectado por RT-PCR en el concentrado, validando de esta forma tanto el funcionamiento de la metodología de concentración viral, como la ausencia de inhibidores de la RT-PCR en la muestra (Bosch et al., 2008). En este sentido, la realización del artículo 1, permitió en primera instancia validar la metodología utilizada mediante la utilización del bacteriófago PP7 como control interno del proceso (Rajal et al., 2007). Y, más interesante aún, fue posible detectar una elevada presencia y carga viral de los tres virus en estas muestras en las cuatro ciudades y a lo largo de todo el año.

Luego de la realización de este primer estudio, y motivados por los buenos resultados obtenidos, el muestreo ambiental fue extendido a otras dos ciudades localizadas al Este del país: Melo y Treinta y Tres. Esto fue realizado en el marco de un proyecto CSIC I+D (Comisión sectorial de Investigación Científica, Proyecto de Investigación y Desarrollo) en colaboración con la Sección Virología de Facultad de Ciencias (Montevideo, UdelaR) y la empresa estatal O.S.E. (Obras Sanitarias del Estado). Se han cubierto de esta forma las regiones Noroeste y Este del país, mediante el análisis del agua residual de seis ciudades. Cabe aclarar que, en el caso de las ciudades al Este, ambas tienen PTAR (Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales), pero para este segundo estudio solamente fueron analizadas las muestras colectadas a la entrada de la PTAR, antes de su tratamiento (denominadas afluentes o aguas residuales crudas). Esto se debe a que la intención de este estudio era evaluar la epidemiología de

las poblaciones locales a través del análisis de los virus presentes en las aguas residuales, y no la eficiencia de remoción viral de las PTAR. En las ciudades del Este, fue colectada una muestra cada dos meses desde setiembre del 2011 a abril del 2013. En este segundo estudio que incluyó las seis ciudades mencionadas, fue realizada la caracterización molecular mediante secuenciación y análisis filogenético de las cepas detectadas (que no había sido previamente realizado en el artículo 1), para poder compararlas con las cepas detectadas de casos clínicos en Salto, y con cepas clínicas y ambientales de la región y el mundo.

### **5.2.1 – Caracterización Molecular**

De forma general para los tres virus, mediante su caracterización molecular, fue observado lo siguiente: i) una mayor prevalencia de estos virus en las muestras ambientales que en las muestras clínicas; ii) una mayor diversidad genética con más genotipos detectados en las muestras ambientales que en las muestras clínicas; iii) presencia de cepas de virus animales en aguas residuales urbanas humanas; y iv) una correlación casi total entre los genotipos observados en las muestras ambientales con los detectados en las muestras clínicas. Este último resultado, destaca la importancia de investigar virus entéricos en muestras ambientales como una alternativa para conocer la epidemiología de estos virus en las poblaciones en las que no es posible obtener muestras clínicas (Artículos 4 y 5; Lizasoain et al., 2015 – Anexo 1).

#### **5.2.1.1 - RVA**

Mediante la caracterización molecular de RVA a partir de muestras de agua residual, se ha podido observar una diversidad genética mayor que la observada en muestras clínicas con la detección de genotipos humanos comunes, emergentes e inusuales. Este estudio representó el primero en la región en analizar genotipos G y P por análisis filogenético a partir de muestras ambientales, comparándolas con muestras clínicas contemporáneas y de la misma región geográfica, y el segundo en el mundo en realizar un abordaje de este tipo (Ruggeri et al., 2015). Un aspecto interesante se relaciona a que los genotipos comunes y emergentes detectados fueron los mismos que los que se detectaron en muestras clínicas de Salto, evidenciando una circulación de estos en ambas regiones (Artículos 3 y 4). Por ejemplo, mediante este estudio se ha podido comprobar la circulación del genotipo emergente G12 en las regiones Noroeste (a través del análisis de las muestras clínicas de Salto), y Este (a través del análisis de las muestras

ambientales colectadas en Melo y Treinta y Tres) del país. También en concordancia con lo observado en las muestras clínicas, el genotipo G2P[4] fue prevalente durante el año 2011, no ha sido detectado en 2012 y 2013. Esta situación otorga más soporte a la teoría de la fluctuación natural de este genotipo, ya que la disminución en la prevalencia del mismo a partir de 2012 fue observada en muestras clínicas de Salto, y ambientales de otras 5 ciudades.

Cuando se analizan genotipos G y P de RVA a partir de muestras ambientales, es imposible definir combinaciones GXP[X], debido a que es un virus segmentado y muy probablemente en una muestra altamente contaminada como el agua residual, se esté detectando una mezcla de cepas virales de diferentes individuos de la población. Sin embargo, a partir del análisis de los resultados, se ha podido observar la detección de combinaciones GXP[X] típicas en casi todas las muestras analizadas, sean éstas de genotipos comunes, emergentes o inusuales. Esta constatación respalda aún más el uso de aguas residuales como una alternativa válida y muy útil para realizar vigilancia epidemiológica de genotipos de este virus en una población determinada, cuando no se tiene acceso a muestras clínicas de esa población.

Por otra parte, también ha sido muy interesante, la detección de cepas animales de RVA, específicamente el genotipo G3P[3] que es común en perros y gatos pero es un genotipo inusual en humanos. El mismo fue detectado en esa combinación en una única muestra, pero, por otro lado, fue detectado el G3-Linaje I (típico de RVA animales, generalmente en combinación con P[3]), o el P[3], por separado, en las dos regiones del país que fueron analizadas. Este genotipo puede haber sido excretado por humanos infectados (sintomáticos o asintomáticos), o por el descarte de la materia fecal de los perros y gatos en el inodoro (como ya ha sido discutido en el artículo 4). Otra alternativa probable está relacionada al hecho de que en la ciudad de Salto es frecuente observar la conexión ilegal del agua de patio al sistema de agua residual, la que debería estar conectada al sistema fluvial que lleva el agua desde el patio hasta la alcantarilla de la calle. Esto provocaría que las heces de las mascotas, que generalmente se mantienen en los patios de los hogares, ante un evento de lluvia, sean introducidas en el sistema cloacal de aguas residuales. Por último, cabe destacar que este resultado concuerda con lo que se ha observado en otro estudio en el que AstV y NV caninos fueron detectados a partir del mismo grupo de muestras de agua residual (Lizasoain et al., 2015 – Anexo 3).

### 5.2.1.2 – NV

Al igual que se observó para RVA y MAstV-1, fue observada una mayor diversidad de cepas circulantes de NV en muestras ambientales en comparación con lo observado en muestras clínicas. En el caso de NV esta diferencia fue aún mayor, ya que en primer lugar fue detectado en una elevada prevalencia el genotipo GI, pudiéndose secuenciar y analizar un número importante de cepas de éste. El GI no pudo ser secuenciado a partir de las muestras clínicas de Salto, en donde se observó su prevalencia muy baja. En segundo lugar, fueron detectados seis genotipos diferentes de GI y siete diferentes de GII y fue observada la circulación de hasta cinco genotipos diferentes en un mes (Artículo 5). Por otro lado, los genotipos detectados en los casos clínicos agruparon junto con los detectados en las muestras ambientales, demostrando la distribución en ambas regiones analizadas de los mismos genotipos que provocan casos de hospitalización por GA en Salto.

Esta diferencia en la detección de GI en una alta prevalencia en muestras ambientales y la no detección del mismo en muestras clínicas, podría estar vinculado a lo observado por Matthews y colaboradores (2012) que sugieren que el GI estaría más asociado a la transmisión por aguas que por otras vías de transmisión, en tanto que el GII estaría más asociado a la vías de transmisión a través de alimentos y contacto persona-a-persona. Por esta razón el GII es más prevalente en casos clínicos ya que esta última vía de transmisión ha sido reportada como la más importante para los NV (Green, 2013). Por otra parte, otros estudios demostraron que partículas virales de GI son muy estables en agua, inclusive más que las de GII (Charles et al., 2009; Seitz et al., 2011).

Al igual que lo observado en la investigación de NV en muestras clínicas, el protocolo de Kitajima y col. (2010) demostró ser más sensible que el protocolo direccionado a la región A del ORF1 (Boxman et al., 2006), habitualmente utilizado como método de screening de NV en muestras ambientales. En otro trabajo más reciente este protocolo ha demostrado ser aún más sensible que protocolos de RT-PCR en tiempo real (Kitajima et al., 2012).

Un aspecto interesante ha sido la detección del genotipo GII.4 también en muestras ambientales. En este caso fue observado un fenómeno interesante de remplazo total de la variante pandémica GII.4 New Orleans 2009 (que circuló durante el primer semestre del 2012), por la variante GII.4 Sydney 2012 (que circuló durante el segundo semestre del 2012). Esta observación concuerda con lo observado a nivel clínico, en

donde el GII.4 New Orleans 2009 fue detectado durante el primer semestre de 2012. Este fenómeno de remplazo fue corroborado mediante un segundo estudio, en el que se realizó un análisis espacio-temporal de estas cepas GII.4 detectadas utilizando un análisis de coalescencia. En ese estudio se observaron dos aumentos en el número de infecciones en el momento en el que fueron introducidas las variantes New Orleans 2009 y Sydney 2012, respectivamente. Ello está de acuerdo con lo que se ha reportado que ocurre cuando es introducida una nueva variante pandémica de GII.4 en la población (Bull et al., 2011; Ramani et al., 2014).

### **5.2.2 – Distribución de genotipos por región geográfica**

Al comparar las dos regiones geográficas analizadas se han observado algunas diferencias en cuanto a la circulación de genotipos de RVA y NV entre ambas regiones.

En el caso de RVA fue observada una mayor prevalencia del G2 en el Noroeste que en el Este, en coincidencia con lo observado para las muestras clínicas de Salto, que también es una ciudad del Noroeste del país. Por otro lado, el genotipo G12 fue solamente detectado en la región Este. Por esta razón y tomando en cuenta su detección previa en muestras clínicas al Noroeste del país, se puede suponer que este genotipo circula en las poblaciones de ambas regiones. Esto está en concordancia con trabajos recientes realizados en Brasil, que reportan un aumento en la prevalencia de este genotipo, que llega a ser inclusive el más prevalente en determinados períodos (Neves et al., 2015; Luchs et al., 2015).

En el caso de NV fue observada una mayor diversidad de cepas circulando en la región Noroeste del país, en tanto que, en la región Este, se ha observado una mayor prevalencia del GII.4. Esta última observación, podría estar relacionada con los reportes del aumento contemporáneo en la prevalencia de este genotipo en muestras clínicas y ambientales en las regiones fronterizas o cercanas de Brasil (región Sur) y Argentina (Buenos Aires) (Fioretti et al. 2011; Fernandez et al. 2012; Andrade et al. 2014; Raboni et al. 2014).

### **5.2.3 – Distribución temporal de genotipos**

En el caso de RVA para la región Noroeste del país, fue observado un patrón de estacionalidad marcado con un pico de detección en invierno. Esto es coincidente con lo observado para las muestras clínicas de Salto, en el que fue observado el mismo patrón de estacionalidad durante los dos años de estudio. Por otra parte, esto concuerda con lo

que se ha observado en otros estudios en cuanto a la distribución temporal de RVA en países de clima templado, tanto en muestras clínicas como ambientales (Cook et al., 2009; Li et al., 2011). Sin embargo, en el caso de RVA para la región Este, no se observó un patrón claro de estacionalidad. Esto también ha sido observado en otros trabajos en los que se han realizado estudios de RVA a partir de muestras clínicas y ambientales. En esos trabajos, se ha detectado un patrón de estacionalidad marcado con un pico de detección en invierno para las muestras clínicas, en tanto que, por otro lado, se ha observado una circulación continua durante todo el año sin una estacionalidad definida en muestras ambientales (Fumian et al., 2011; Ruggeri et al., 2015).

En el caso de NV, fue observada una presencia continua de diferentes genotipos de GII a lo largo de todo el período de estudio, y, por otro lado, el genotipo GI fue casi no detectado durante el período de aproximadamente un año. Este resultado difiere de lo observado para este genotipo en las muestras clínicas de Salto, donde NV fue detectado principalmente en otoño de 2012 (tanto GII como GI). Sin embargo, la presencia de genotipos de GII y GI en muestras ambientales no está uniformemente distribuida en el tiempo, como fue observado por Mans y colaboradores (2013). Estos autores, observaron variaciones en la frecuencia de detección de GI y GII de año a año, observando también períodos largos (de 6 meses) sin detección de uno de ellos.

Por otra parte, cabe destacar que el muestreo de ambas regiones fue diferente: i) quincenal durante 2011 para el Noroeste; y ii) bimensual de setiembre de 2011 a abril de 2013 para el Este. Esto genera dificultades para poder establecer conclusiones de estacionalidad a partir de datos tomados de ambos estudios en conjunto, así como también genera dificultades para poder realizar comparaciones entre ambas regiones. En este sentido, más estudios con una única estrategia de muestreo (por ejemplo, colecta de una muestra por mes), y durante el mismo período de tiempo (que debería comprender por lo menos dos años de duración) en ambas regiones, son necesarios para determinar patrones más exactos de estacionalidad en estas regiones del país.

## 6 – CONCLUSIONES

- Se realizó un estudio de epidemiología molecular prospectivo y descriptivo investigando RVA, NV y MAstV-1 en niños hospitalizados con GA en la ciudad de Salto durante 2011 y 2012. Representando el primer estudio molecular que permitió caracterizar en profundidad a estos tres virus en el interior del país.
- La caracterización molecular determinando genotipos G y P de RVA reveló la circulación de genotipos comunes (G1P[8], G2P[4] y G3P[8]) y emergentes (G12[8], G12 G2P[9]) en humanos.
- La caracterización molecular de NV mostro una la circulación de genotipos de distribución global, entre ellos, la cepa pandémica *GII.4 New Orleans 2009*.
- Se evidencio la circulación de la cepa recombinante GII.P7-GII.6 en los casos clínicos de GAI de Salto.
- La caracterización molecular de MAstV-1 reveló la circulación de tres genotipos diferentes: HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-3.
- Se pudo realizar un estudio de virología ambiental mediante la caracterización molecular de estos virus entéricos a partir de las aguas residuales de 6 ciudades del interior del país. Representando el primer estudio en esta área investigando RVA y NV en el interior del país y a nivel país-
- La caracterización molecular de estos tres virus, a nivel ambiental, mostró de forma general una elevada prevalencia y gran diversidad genética circulante, mayor que la observada en las muestras clínicas.
- Fue observada una correlación casi total entre las cepas caracterizadas en muestras clínicas y ambientales, remarcando la importancia de la investigación de virus entéricos a partir de aguas residuales como alternativa de vigilancia epidemiológica cuando no se tiene acceso a muestras clínicas de la población.
- El estudio de estos virus a partir de aguas residuales mostró además: i) la detección de genotipos inusuales en humanos de RVA (posiblemente cepas originadas de animales), y ii) la observación de un evento de sustitución de una variante pandémica de NVGII.4 por otra, en el transcurso de un año, siendo ambas introducciones asociadas a un aumento en el número de infecciones en la población.

## **7 – PERSPECTIVAS**

- Redacción de dos artículos científicos con los datos obtenidos de NV y MAstV-1, respectivamente, a partir del análisis de las muestras clínicas.
- Difundir a nivel nacional los resultados obtenidos en el marco de la presente tesis, en particular a la comunidad médica pediátrica, mediante publicación de trabajos en revistas médicas nacionales.
- Continuar con el monitoreo de las GA de etiología viral mediante estudios de epidemiología molecular en la ciudad de Salto. Buscando expandir el estudio a otras ciudades de interior y también Montevideo, mediante convenios con el MSP y la creación de una red de vigilancia en colaboración con grupos de virología de la capital del país.
- Continuar con el monitoreo de estos tres virus a partir de aguas residuales en diferentes ciudades representantes de las distintas regiones del país. Colectando también en puntos aguas abajo en el Río Uruguay (en el caso de las 4 ciudades al Noroeste del país), con el fin de evaluar la diseminación de estos virus en el mencionado río.
- Investigar la presencia de otros virus entéricos humanos minoritarios (algunos de ellos ya detectados en las muestras ambientales, ver Anexos), a partir de las muestras clínicas y ambientales ya colectadas, tales como: Aikivirus-1 (muestras clínicas), MAstV-6 (muestras clínicas), AdVE, MAstV-8, MAstV-9, RVB, RVC, NV GIV, Sapovirus y Klassevirus.
- Realizar estudios de metagenómica mediante secuenciación masiva a partir de algunas muestras clínicas y ambientales seleccionadas.
- Realizar estudios de genómica de RVA en muestras seleccionadas, representativas de cada uno de los genotipos que fueron detectados.
- Analizar la presencia de cepas recombinantes de NV a partir de todas las muestras clínicas y ambientales colectadas, mediante la utilización del protocolo descrito en el Artículo 2.
- Amplificar el ORF2 completo de las cepas de HAstV-3 detectadas en las muestras clínicas, para confirmar si se trata de un nuevo linaje aún no descrito dentro de este genotipo.
- Desarrollar metodologías de cultivos celulares para el estudio de la infectividad viral en distintas matrices ambientales, a través de la metodología denominada “PCR integrado a cultivo celular” o ICC-PCR.

## 8 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Abad FX**, Pinto RM, Villena C, et al. Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol*, **1997**, 63(8), p.3119–3122.
- **Abad FX**, Villena C, Guix S, et al. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *App ENV Microbiol*, **2001**, 67(9), p.3904-3907.
- **Aboudy Y**, Shif I, Zilberstein I, Gotlieb-Stematsky T. Use of polyclonal and monoclonal antibodies and analysis of viral RNA in the detection of unusual group A human rotaviruses. *J Med Virol*, **1988**, 25(3):351-9.
- **Ahmed SM**, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **2014**, 14(8):725-30.
- **Akihara S**, Phan TG, Nguyen TA, et al. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day carecenter in Japan. *Arch Virol*, **2005**, 150(10):2061-75.
- **Anderson EJ**, **Weber SG**. Rotavirus infections in adults. *Lancet Infect Dis*, **2004**, 4(2):91e9.
- **Anderson EJ**. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. *Lancet Infect Dis*, **2008**, 8:642-9.
- **Andreasi MS**, Cardoso DD, Fernandes SM, et al. AdeNV irus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cuz*, **2008**, 103(7):741-44.
- **Ansari SA**, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis* **1991**, 13, 448–461.
- **Appleton H**, **Higgins PG**. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*, **1975**, 1(7919), p.1297.
- **Aragão GC**, Mascarenhas JD, Kaiano JH, et al. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One*, **2013**, 8(2):e56608.
- **Arias A**, Emmott E, Vashist S, et al. Progress towards the prevention and treatment of norovirus infections. *Future Microbiol*, **2013**, 8(11):1475-87.
- **Arvelo W**, Sosa SM, Juliao P, et al. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *J Clin Virol*, **2012**, 55(1):8-11.
- **Asano T**, **Cotruvo JA**. Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater: health and regulatory considerations. *Water Res*, **2004**, 38(8):1941-51.
- **Atmar RL**, **Estes MK**. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*, **2001**, 14(1):15-37.
- **Aw TG**, **Gin KY**. Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. *J App Microbiol*, **2010**, 109(2), p.716-730.
- **Aw TG**, **Gin KY**. Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface waters of tropical urban catchments. *J App Microbiol*, **2011**, 110(4), p.903-914.
- **Aw TG**, Howe A, Rose JB. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. *J Virol Meth*, **2014**, 210C, p.15-21.
- **Babkin IV**, TikuNV AY, Zhirakovskaia EV, et al. High evolutionary rate of human astrovirus. *Inf Gen Evol*, **2012**, 12(2), p.435–442.
- **Badger GF**, Curtiss C, Dingle JH, et al. A study of illness in a group of Cleveland families: XI. The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg*, **1956**, 64(3):348-56.
- **Ball JM**, Graham DY, Opekun AR, et al. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology*, **1999**, 117(1):40-8.
- **Ballard SB**, Reaves EJ, Luna CG, et al. Epidemiology and Genetic Characterization of Noroviruses among Adults in an Endemic Setting, Peruvian Amazon Basin, 2004-2011. *PLoS One*, **2015**, 10;10(7):e0131646.
- **Banerjee I**, Iturriza-Gomara M, Rajendran P, et al. Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3] human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India. *J Med Virol*, **2007**, 79(11):1768-74.
- **Banos-Lara MR**, **Méndez E**. Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology*, **2010**, 401(2), p.322-332.
- **Bányai K**, László B, Duque J, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, **2012**, 27; 30 Suppl 1:A122-30.
- **Barclay L**, Park GW, Vega E, et al. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol Infect*. **2014**, Aug;20(8):731-40.
- **Barker J** & **Vipond IB**. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *Inf Cont*, **2004**, 42-49.

- **Barreira** DM, Ferreira MS, Fumian TM, et al. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol*, **2010**; 47(1):60-4.
- **Barril** PA, Fumian TM, Prez VE, et al. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ Res*, **2015**, 138:409-15.
- **Barril** PA, Giordano MO, Isa MB, et al. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol*, **2010**, 82(7):1277-81.
- **Bates** J, Goddard MR, Butler M. The detection of rotaviruses in products of wastewater treatment. *J Hyg (Lond)*, **1984**, 93(3):639-43.
- **Battisti** C, Salviato A, Jonassen C, et al. Genetic characterization of astroviruses detected in guinea fowl (*Numida meleagris*) reveals a distinct genotype and suggests cross-species transmission between turkey and guinea fowl. *Arch Virol*, **2012**, 157(7), p.1329–1337.
- **Baxendale** W, **Mebatsion** T. The isolation and characterization of astroviruses from chickens. *Avian Path*, **2004**, 33(3), p.364-370.
- **Becker-Dreps** S, Bucardo F, Vilchez S, et al. Etiology of childhood diarrhea after rotavirus vaccine introduction: a prospective, population-based study in Nicaragua. *Pediatr Infect Dis J*, **2014**, 33(11):1156-63.
- **Belliot** G, Laveran H, Monroe SS. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *Journal of Medical Virology*, **1997**, 51(2), p.101-106.
- **Belliot** G, SosNV tsev SV, Mitra T, et al. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol*, **2003**, 77(20):10957-74.
- **Bereciartu** A, Bok K, Gómez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol*, **2002**, 25(2):197-203.
- **Bernstein** DI, Atmar RL, Lyon GM, et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J Infect Dis*, **2015**, 15;211(6):870-8.
- **Berois** M, Libersou S, Russi J, et al. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999. *J Med Virol*, **2003**, 71(3):456-62.
- **Bertolotti-ciarlet** A, Crawford SE, Hutson AM, et al. The 3J End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1 : a NV el Function for the VP2 Protein. *J Virol*, **2003**, 77(21):11603–15.
- **Beuret** C, Kohler D, Baumgartner A, et al. Norwalk-like viruses sequences in mineral waters: one- year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol*, **2002**, 68(4): 1925-31.
- **Bishop** RF, Davidson GP, Holmes IH, et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, **1973**, 8; 2(7841):1281-3.
- **Black** RE, Cousens S, Johnson HL, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, **2010**, 375:1969–1987.
- **Blacklow** NR, Dolin R, Fedson DS, et al. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. *Ann Intern Med*, **1972**, 76(6): 993–1008.
- **Blomström** AL, Widén F, Hammer AS, et al. Detection of a NV el astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol*, **2010**, 48(12), p.4392-4396.
- **Borges** AM, Teixeira JM, Costa PS, et al. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2006**, 101(7):721-24.
- **Bosch** A, Guix S, Sano D, et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol*, **2008**, 19(3):295-301.
- **Bosch**, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol*, **1998**, 1(3), p.191-196. Review.
- **Bosch** A, Guix S, Krishna NK, et al. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, **2012**.
- **Bosch** A, Pinto RM, Blanch AR, et al. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Water Res*, **1988**, 22, 343–348.
- **Bosch** A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev*, **2014**, 27(4), p.1048-1074.
- **Boxman** IL, Vennema H, Jonker K, et al. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*, **2006**; 108: 391-396.
- **Bresee** JS, Marcus R, Venezia RA et al; US Acute Gastroenteritis Etiology Study Team. The etiology of severe acute gastroenteritis among adults visiting emergency departments in the United States. *J Infect Dis*, **2012**, 1;205(9):1374-81.

- **Brinker** JP, Blacklow NR, Herrmann JE. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch Virol*, **2000**, (145), p.1847–1856.
- **Brown** KH, Peerson JM, Baker SK, et al. Preventive zinc supplementation among infants, preschoolers, and older prepubertal children. *Food Nutr Bull*, **2009**, 30:S12–S40.
- **Bruin** ED, Duizer E, Vennema H, et al. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods*, **2006**, 137(2): 259-64.
- **Bucardo** F, Lindgren PE, Svensson L, et al. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PLoS One*, **2011**, 6(10):e25962.
- **Bucardo** F, Nordgren J, Carlsson B, et al. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol*, **2008**, 46(8):2573–80.
- **Bull** RA, Eden JS, Rawlinson WD, et al. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog*, **2010**; 6(3):e1000831.
- **Bull** RA, White PA. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol*, **2011**, 19(5):233-40.
- **Bull** RA, Hansman GS, Clancy LE, et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*, **2005**, 11, 1079–1085.
- **Bull** RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol*, **2007**, 88, 3347–3359.
- **Caballero** S, Guix S, Ribes E, et al. Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells. *J Virol*, **2004**, 78(23), p.13285–13292.
- **Campos** GS, Moreau VH, Bandeira A, et al. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol*, **2008**, 153(6): 1125-29.
- **Cannon** RO, Poliner JR, Hirschhorn RB, et al. A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J Infect Dis*, **1991**; 164(5):860-63.
- **Cardoso** DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, et al. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit*, **2002**, 8(9):CR624-8.
- **Carter** MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*, **2005**, 98(6):1354-80.
- **Castello** AA, Arvay ML, Glass RI, et al. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J*, **2004**, 23(10 Suppl):S168-72.
- **Castriciano** S, Luinstra K, Petrich A, et al. Comparison of the RIDASCREEN norovirus immunoassay to IDEA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods*, **2007**, 141 (2): 216-19.
- **Caul** EO. Viral Gastroenteritis: small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet*, **1994**, 343(8980):1240-42.
- **Caul** EO, **Appleton** H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol*, **1982**, 9(4), p.257-265.
- **CDC**. Centers for Disease Control and Prevention. Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep*, **2011**, 60(RR-3):1-18.
- **CDC**. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus outbreaks on three college campuses - California, Michigan, and Wisconsin, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **2009**, 58(39):1095-100.
- **Cecílio** AB, de Faria DB, Oliveira P de C, et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J Ethnopharmacol*, **2012**, 14;141(3):975-81.
- **Chandran** A, Fitzwater S, Zhen A, et al. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics*, **2010**, 9;4:213-29.
- **Chang** KO, George DW. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *J Virol*, **2007**, 81(22):12111-18
- **Charles** KJ, Shore J, Sellwood J, et al. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *J Appl Microbiol*, **2009**, 106(6):1827-37.
- **Cheetham** S, Souza M, Meulia T, et al. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol*, **2006**, 80(21):10372-81.
- **Chu** DK, Chin AW, Smith GJ, et al. Detection of NV el astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J Gen Virol*, **2010**, 91(Pt 10), p.2457-2462.
- **Colomba** C, Grazia S, Giammanco GM, et al. Viral gastroenteritis in children hospitalized in Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol and Inf Dis*, **2006**, 25(9), p.570–575.
- **Cook** SM, Glass RI, LeBaron CW, et al. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ*, **1990**, 68(2):171-7.
- **Cotterill** H, **Curry** A, Riordan T. Rotavirus in vomit. *J Infect*, **1988**, 16:206–207.

- **Cubitt** WD, Mitchell DK, Carter MJ, et al. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol*, **1999**, 57(3), p.313–321.
- **da Silva** MF, Gómez MM, Rose TL, et al. VP8\*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. *Infect Genet Evol*, **2013**, 16: 200-5.
- **Dai** YC, Xu QH, Wu XB, et al. Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Arch Virol*, **2010**, 155(6), p.977–982.
- **Dalton** RM, Pastrana EP, Sánchez-Fauquier A. Vaccinia virus recombinant expressing an 87-kilodalton polyprotein that is sufficient to form astrovirus-like particles. *J Virol*, **2003**, 77(16), p.9094–9098.
- **Daniels** NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ, et al. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis*, **2000**, 181(4): 1467-70.
- **Das** BK, Gentsch JR, Cicirello HG, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*, **1994**, 32: 1820-1822.
- **Davidson** GP, Bishop RF, Townley RR, et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*, **1975**, 1(7901):242-6.
- **Andrade** Jda S, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, et al. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol*, **2014**, 61(3):345-52.
- **De Benedictis** P, Schultz-Cherry S, Burnham A, et al. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Inf Gen Evol*, **2011**, 11(7), p.1529-1544.
- **De Grazia** S, Martella V, Giammanco GM, et al. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, **2007**, 13(7):1091-3.
- **De Grazia** S, Martella V, Chironna M, et al. Nationwide surveillance study of human astrovirus infections in an Italian pediatric population. *Epid & Inf*, **2013**, 141(3), p.524-528.
- **De Grazia** S, Medici MC, Pinto P, et al. Genetic heterogeneity and recombination in human type 2 astroviruses. *J Clin Microbiol*, **2012**, 50(11), p.3760–3764.
- **De Grazia** S, Platia MA, Rotolo V, et al. Surveillance of human astrovirus circulation in Italy 2002-2005: emergence of lineage 2c strains. *Clin Microbiol & Inf*, **2011**, 17(1), p.97–101.
- **De Sierra** MJ, Sánchez AM, Quiricci L, et al. Electropherotypes of rotaviral RNA from cases of infantile diarrhea in Uruguay. *Acta Virol*, **2002**, 46(2):103-6.
- **Debbink** K, Donaldson EF, Lindesmith LC, et al. Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. *J Virol*, **2012**, 86(2):1214-26.
- **Debbink** K, Lindesmith LC, Baric RS. The state of norovirus vaccines. *Clin Infect Dis*, **2014**, 58(12):1746-52.
- **Delfino** M, Boulay M, Sandín D, et al. Infección intrahospitalaria por rotavirus en salas generales de pediatría del Centro Hospitalario Pereira Rossell. *Arch Pediatr Urug*, **2006**, 77(4): 349-354.
- **Dennehy** PH. Rotavirus Infection: A Disease of the Past? *Infect Dis Clin North Am*, **2015**, 1. pii: S0891-5520(15)00064-1.
- **Dennehy** PH. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr Infect Dis Rep*, **2013**, 15(3): 242-250.
- **Desselberger** U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv Virus Res*, **1996**, 46, 69-95.
- **Desselberger** U. Rotavirus infections: Guidelines for treatment and prevention. *Drugs*, **1999**, 58(3), 447–452.
- **Díaz** TJ, Solari GV, Cáceres CO et al. Outbreaks of acute gastroenteritis in Antofagasta Region, Chile 2010. *Rev Chilena Infectol*, **2012**, 29(1):19-25.
- **Dingle** JH, McCorkle LP, Badger GF, et al. A study of illness in a group of Cleveland families:XXXI. Clinical description of acute nonbacterial gastroenteritis. *Am J Hyg*, **1956**, 64:368-75.
- **Doménech-Sánchez** A, Juan C, Pérez JL, et al. Unmanageable norovirus outbreak in a single resort located in the Dominican Republic. *Clin Microbiol Infect*, **2011**, 17(6):952-54.
- **Donaldson** EF, Lindesmith LC, Lobue AD, et al. Viral shapeshifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol*, **2010**, 8:231–41.
- **Dong** J, Dong L, Méndez E, et al. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc Nat Acad Scie USA*, **2011**, (108), p.12681–12686.
- **Drummond** AJ, Ho SY, Phillips MJ, et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol*, **2006**, 4 (5):e88.
- **Drummond** AJ, Rambaut A, Shapiro B, et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol*, **2005**, 22 (5):1185–1192.

- **Drummond** AJ, Suchard MA, Xie D, et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol*, **2012**, 29 (8):1969–1973.
- **Eden** JS, Hewitt J, Lim KL, et al. The emergence and evolution of the NV el epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology*, **2014**, 450-451:106-13.
- **Eden** JS, Tanaka MM, Boni MF, et al. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol*, **2013**, 87(11):6270-82.
- **El-Kamary** SS, Pasetti MF, Mendelman PM, et al. Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues. *J Infect Dis*, **2010**, 202(11):1649-58.
- **Espinosa** AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, et al. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, **2003**, 42(10–11), 20082618–2628.
- **Espul** C, Martínez N, Noel JS, et al. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol*, **2004**, 72(1), p.75-82.
- **Estes** MK, Ball JM, Guerrero RA, et al. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis*, **2000**, 181 (2):S367-73.
- **Estes** MK, **Greenberg** HB. Rotaviruses. *Fields Virology*. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; **2013**.
- **Estes** MK. Rotaviruses and Their Replication. *Fields Virology*, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, **2001**.
- **Fankhauser** RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, **2002**, 186(1):1–7.
- **Fernández** J, de Oña M, Melón S, et al. Noroviruses as cause of gastroenteritis in elderly patients. *Aging Clin Exp Res*, **2011**, 23(2):145-7.
- **Fernández** MD, Torres C, Poma HR, et al. Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. *Sci Total Environ*, **2012**, 15;437:262-9.
- **Ferrari** AM, Ferreira A, De Leonardi D, et al. Mortalidad hospitalaria en un hospital pediátrico de referencia nacional: Centro Hospitalario Pereira Rossell. *Rev Med Urug*, **2002**, 18 (1): 59-65.
- **Ferrari** AM, Mendez MV, Alonso R, et al. Diarrea aguda infantil Infantile acute diarrhea associated with rotavirus. *Arch Pediatr Urug*, **1985**, 56:85–90.
- **Ferreira** FFM, Guimarães FR, Fumian TM, et al. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci Technol*, **2009**, 60:633-42.
- **Ferreira** MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, et al. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol*, **2010a**, 82(8):1442-48.
- **Ferreira** MS, Xavier Mda P, Tinga AC, et al. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One*, **2012a**, 7(3):e33754.
- **Ferreira** MS, Xavier MP, Fumian TM, et al. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol*, **2008**, 80(2):338-44.
- **Ferreira** RG, Borges AMT, Fiaccadori FS, et al. Gastroenteric virus detection in fecal samples from woman in Goiânia, State of Goiás, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, **2010b**, 43(3): 240-43.
- **FindModel**: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>. Herramienta bioinformática disponible en Base de datos de HIV de Los Álamos, **2015**.
- **Finkbeiner** SR, Holtz LR, Jiang Y, et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of NV el astroviruses. *Virol J*, **2009a**, 6(161).
- **Finkbeiner** SR, Kirkwood C.D., Wang, D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virol J*, **2008**, 5(117).
- **Finkbeiner** SR, Li Y, Ruone S, et al. Identification of a NV el astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol*, **2009c**, 83(20), p.10836-10839.
- **Fioretti** JM, Bello G, Rocha MS, et al. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One*, **2014**, 25;9(3):e92988.
- **Fioretti** JM, Ferreira MS, Victoria M, et al. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2011**, 106(8):942-47.
- **Firth** AE, **Atkins** JF. Candidates in Astroviruses, Seadornaviruses, Cytorhabdoviruses and Coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning. *Virol J*, **2010**, 7(17).
- **Fischer** TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, et al. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. *J Infect Dis*, **2002**, 186(5):593-7.
- **Flewett** TH, Davies H, Bryden AS, et al. Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Pathol*, **1974**, 27(8):608-14.

- **Flewett TH & Woode GN.** The rotaviruses. *Arch Virol*, **1978**, 57, 1-23.
- **Flores J, Perez-Schael I, Boeggeman E, et al.** Genetic relatedness among human rotaviruses. *J Med Virol*, **1985**, 17:135–143.
- **Fong TT, Lipp EK.** Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol & Mol Biol Rev*, **2005**, 69(2): 357-371.
- **Franco MA, Angel J, Greenberg HB.** Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, **2006**, 24:2718–2731.
- **Francy DS, Stelzer EA, Bushon et al.** Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. *Water Res*, **2012**, 46(13), p.4164-4178.
- **Fu Y, Pan M, Wang X, et al.** Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. *J Gen Virol*, **2009**, 90(Pt 5), p.1104-1108.
- **Fuentes C, Bosch A, Pinto RM, et al.** Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *J Virol*, **2012**, 86(18), p.10070-10078.
- **Fumian TM, Justino MC, D'Arc Pereira Mascarenhas J, et al.** Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Clin Virol*, **2013**, 58(1):31-5.
- **Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, et al.** Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods*, **2010**; 170:42-6.
- **Fumian TM, Leite JPG, Rose TL, et al.** One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res*, **2011**, 45:5755-63.
- **Fumian TM, Vieira CB, Leite JP, Miagostovich MP.** Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*, **2013**, 11(1):110-9.
- **Fumian TM, Leite JP, Marin VA, et al.** A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J Virol Methods*, **2009**, 155, 39-43.
- **Fumian TM, Aragao GC, Mascarenhas JDP, et al.** Detection of a NV el recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch Virol*, **2012**, 157, 2389–2392.
- **Gabbay YB, Glass RI, Monroe SS, et al.** Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. *Am J Epidemiol*, **1994**, 1;139(7):728-33.
- **Gabbay YB, Leite JP, Oliveira DS, et al.** Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belem, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982-2000): identification of two possible new lineages. *Virus Res*, **2007a**, 129(2), p.166–174.
- **Gabbay YB, Linhares AC, Oliveira DS, et al.** First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2007b**, 102(4), p.531-534.
- **Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, et al.** Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, **1998**, 36(12):3691-3.
- **Galeano ME, Martinez M, Amarilla AA, et al.** Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004-2005: description of a possible new GII.4 cluster. *J Clin Virol*, **2013**, 58(2):378-84.
- **Gallimore CI, Cheesbrough JS, Lamden K, et al.** Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. *Int J Food Microbiol*, **2005**, 15;103(3):323-30.
- **Gallimore CI, Lewis D, Taylor C, et al.** Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J Clin Virol*, **2004**, 30 (2): 196-204.
- **Gastañaduy PA, Vicuña Y, Salazar F, et al.** Transmission of Norovirus Within Households in Quininde, Ecuador. *Pediatr Infect Dis J*, **2015**, 34(9):1031-3.
- **Geigenmüller U, Ginzton NH, Matsui SM.** Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J Gen Virol*, **2002**, 83(Pt 7), p.1691-1695.
- **Gentsch JR, Glass RI, Woods P, et al.** Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **1992**, 30: 1365-1373.
- **Georgiadis S, Pilger DA, Pereira F, et al.** Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. *Rev Soc Bras Med Trop*, **2010**, 43(3):277-80.
- **Georgiadou SP, Loukeris D, Smilakou S, et al.** Effective control of an acute gastroenteritis outbreak due to norovirus infection in a hospital ward in Athens, Greece, April 2011. *Euro Surveill*, **2011**, 16 (28): 19915.
- **Ghosh S & Kobayashi N.** Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiol*, **2011**, Sep;6(9):1049-65.

- **Giordano** MO, Ferreyra LJ, Isa MB, et al. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba City, Argentina: an insight of disease burden. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **2001**, 43(4):193-7.
- **Giordano** MO, Martinez LC, Isa MB, et al. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a Public Hospital in Cordoba city, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **2004**, 46(2):93-6.
- **Glass** RI, Parashar, UD, Estes MK. Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med*, **2009**, 361(18):1776-85.
- **Glass** RI, Noel J, Mitchell D, et al. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol*, **1996**, Supplement, (12), p.287–300.
- **Gomes** KA, Stupka JA, Diana A, et al. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006. *Rev Argent Microbiol*, **2008**, 40(4):222-28.
- **Gomes** KA, Stupka JA, Gómez J, et al. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol*, **2007**, 79(11):1703-9.
- **Gómez** MM, Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, et al. Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A rotavirus strains during moNV alent vaccine introduction in Brazil. *Infect Genet Evol*, **2014**, 28:486-94.
- **Gonzaga** VE, Ramos M, Maves RC, et al. Concurrent outbreak of norovirus genotype I and enterotoxigenic *Escherichia coli* on a U.S. Navy ship following a visit to Lima, Peru. *PLoS One*, **2011**, 6(6):e20822.
- **González** GG, Liprandi F, Ludert JE. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol*, **2011**, 83(11):1972-82.
- **Gordon** I, Ingraham HS, Kornis RF. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal isolates. *J Exp Med*, **1947**, 86(5):409-22.
- **Götz** H, de Jong B, Lindbäck J, et al. Epidemiological investigation of a food-borne gastroenteritis outbreak caused by Norwalk-like virus in 30 day-care centres. *Scand J Infect Dis*, **2002**, 34(2):115-21.
- **Gouvea** V, Glass RI, Woods P, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*, **1990**, 28(2):276-82.
- **Graham** DY, Dufour GR. Minimal infective dose of rotavirus. *Arch Virol*, **1987**, 92, 261–271.
- **Grant** L, Esona M, Gentsch J, et al. Detection of G3P[3] and G3P[9] rotavirus strains in American Indian children with evidence of gene reassortment between human and animal rotaviruses. *J Med Virol*, **2011**, 83(7):1288-99.
- **Green** KY. *Caliciviridae: The Norovirus*. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2007**.
- **Green** KY. *Caliciviridae: The Noroviruses*. Fields Virology. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; **2013**.
- **Green** KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Inf Dis*, **2000**, 181(Suplemento 2), Mayo, p.322-330.
- **Greenberg** HB, Wyatt RG, Kapikian AZ. Norwalk virus in vomitus. *Lancet*, **1979**, 1:55.
- **Grimm** AC, Cashdollar JL, Williams FP, et al. Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, realtime, and integrated cell culture/RT-PCR. *Can J Microbiol*, **2004**, 50(4), p.269–278.
- **Guerrero** ML, Noel JS, Mitchell DK, et al. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Ped Inf Dis J*, **1998**, 17(8), p.723–727.
- **Guix** S, Caballero S, Bosch A, et al. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J Virol*, **2004**, (78), p.13627–13636.
- **Guix** S, Caballero S, Villena C, et al. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol*, **2002**, 40(1), p.133-139.
- **Gutiérrez-Escolano** AL, Brito ZU, del Angel RM, et al. Interaction of cellular proteins with the 5' of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol*, **2000**, 74(18):8558-62.
- **Hagbom** M, Istrate C, Engblom D, et al. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog*, **2011**, 7(7):e1002115.
- **Hall** AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, et al. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004–2005. *Emerg Infect Dis*, **2011**, 17(8):1381-88.
- **Han** MG, Smiley JR, Thomas C, et al. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J Clin Microbiol*, **2004**, 42(11):5214-24.
- **Harris** J P, Edmunds WJ, Pebody R, et al. Deaths from Norovirus among the Elderly, England and Wales. *Emerg Inf Dis*, **2008**, 14 (10).

- **Hata** A, Kitajima M, Katayama H. Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. *J App Microbiol*, **2013**, 114(2), p.545-554.
- **Hejkal** TW, Smith EM, Gerba CP. Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. *Appl Environ Microbiol*, **1984**, 47(3):588-90.
- **Herring** AJ, Inglis NF, Ojeh CK, et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*, **1982**, 16(3):473-7.
- **Hewitt** J, Bell D, Simmons GC, et al. Gastroenteritis Outbreak Caused by Waterborne Norovirus at a New Zealand Ski Resort. *App & ENV Microbiol*, **2007**, 73 (24), 7853-7857.
- **Ho** SY, Phillips MJ, Drummond AJ, et al. Accuracy of rate estimation using relaxed-clock models with a critical focus on the early metazoan radiation. *Mol Biol Evol*, **2005**, 22 (5):1355–1363.
- **Hoa** Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol*, **2013**, 56(3):185-93.
- **Hoebe** CJ, Vennema H, Husman AM, et al. Norovirus Outbreak among Primary Schoolchildren Who Had Played in a Recreational Water Fountain. *J Inf Dis*, **2004**, 189, 699-705.
- **Holtz** LR, Wylie KM, Sodergren E, et al. Astrovirus MLB2 viremia in febrile child. *Emerg Inf Dis*, **2011b**, 17(11), p.2050-2052.
- **Hopkins** RS, Gaspard GB, Williams FP Jr, et al. A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. *Am J Public Health*, **1984**, 74(3):263-5.
- **Hortal** M, Russi J, Benitez L, et al. Presencia de antígenos de rotavirus y perfiles electroforéticos del ARN a partir de heces de niños con diarrea infecciosa aguda. *Arch Pediatr Urug*, **1986**, 57:143–148.
- **Huynen** P, Mauroy A, Martin C, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J. Clin. Virol*, **2013**, 58, 515–521.
- **ICTV**, **2015**. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy>. Página oficial del Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
- **INE**. Instituto Nacional de Estadística de Uruguay. <http://www5.ine.gub.uy/censos2011/index.html>. Resultados del censo realizado en **2011**.
- **Iritani** N, Seto Y, Kubo H, et al. Prevalence of “Norwalk-like virus” infections in outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999–2000 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol*, **2002**, 66(1):131–38.
- **Isa** P, Realpe M, Romero P, et al. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*, **2004**, 322(2):370-81.
- **Isakbaeva** ET, Widdowson MA, Beard RS, et al. Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg Inf Dis*, **2005**, 11(1):154-58.
- **Iwai** M, Hasegawa S, Obara M, et al. Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol*, **2009**, 75(5), 1264-70.
- **Jakab** F, Walter JE, Berke T, et al. Molecular characterization and sequence analysis of human astroviruses circulating in Hungary. *FEMS Imm & Med Microbiol*, **2003**, 39(2), p.97–102.
- **Jayaram** H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*, **2004**, 101(1):67-81.
- **Jiang** X, Graham DY, Wang K, et al. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, **1990**, 250(4987): 1580-83.
- **Jiang** X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of Norwalk virus capsid protein. *J Virol*, **1992**, 66(11): 6527-32.
- **Jiang** X, Wilton N, Zhong WM, et al. Diagnosis of human caliciviruses by use of Enzyme immunoassays. *J Infect Dis*, **2000**, 181(S2): 349-59.
- **Jiang** B, Monroe SS, Koonin EV, et al. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1993**, (90), p.10539–10543.
- **Jiang** H, Holtz LR, Bauer I, et al. Comparison of NV el MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. *Virology*, **2013**, 436(1), p.8-14.
- **Jonassen** CM, Jonassen TO, Grinde B. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhiNV irus. *J Gen Virol*, **1998**, (79), p.715–718.
- **Jonassen** CM, Jonassen TO, Saif YM, et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol*, **2001**, 82(Pt 5), p.1061-1067.

- **Jones MK**, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, de Graaf M, Freiden P, Graves CL, Koopmans M, Wallet SM, Tibbetts SA, Schultz-Cherry S, Wobus CE, Vinjé J, Karst SM. Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc*, **2015**, 10(12):1939-47.
- **Jones MK**, Watanabe M, Zhu S, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*, **2014**, 7; 346(6210):755-9.
- **Jourdan N**, Maurice M, Delautier D, et al. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol*, **1997**, 71(11):8268-78.
- **Kageyama T**, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, **2003**, 41(4):1548-57.
- **Kamel AH**, Ali MA, El-Nady HG, et al. Evidence of the co-circulation of enteric viruses in sewage and in the population of Greater Cairo. *J Appl Microbiol*, **2010**, 108(5):1620-9.
- **Kane EM**, Turcios RM, Arvay ML, et al. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Publica*, **2004**, 16(6):371-7.
- **Kao CC**, Singh P, Ecker DJ. De NV o initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology*, **2001**, 287, 251–260.
- **Kapikian AZ**, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*, **1972**, 10(5):1075-81.
- **Kapikian AZ**. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis*, **2000**, 181 Suppl 2:S295-302.
- **Kapoor A**, Li L, Victoria J, et al. Multiple NV el astrovirus species in human stool. *Journal of General Virology*, **2009**, 90(Pt 12), p.2965-2972.
- **Karst SM**, **Baric RS**. What is the reservoir of emergent human norovirus strains? *J Virol*. **2015** Jun;89(11):5756-9.
- **Karst SM**. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*, **2010**, 2(3):748-81.
- **Katayama K**, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*, 2002, 1; 299(2):225-239.
- **Katayama H**, Shimasaki A & Ohgaki S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *App ENV Microbiol*, **2002**, 68 (3), 1033-1039.
- **Katayama K**, Miyoshi T, Uchino K, et al. NV el recombinant sapovirus. *Emerg. Infect Dis*, **2004**, 10, 1874–1876.
- **Khamrin P**, Maneekarn N, Peerakome S, et al. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol*, **2006**, 78(7):986-94.
- **Kimura H**, Nitami K, Mizuguchi A. Descriptive epidemiology for two outbreak cases of norovirus gastroenteritis in an elementary school. *Nihon Koshu Eisei Zasshi*, **2012**, 59(2):101-11.
- **Kirby A**, Dove W, Ashton L, et al. Detection of norovirus in mouthwash samples from patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol*, **2010**, 48(4):285-7.
- **Kirkwood CD**, **Streitberg R**. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J Clin Virol*, **2008**, 43(3):346–48.
- **Kirkwood CD**. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis*, **2010**, 1(202 Suppl):S43-8.
- **Kitajima M**, Oka T, Haramoto E, et al. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol*, **2010**, 44(18), 7116-22.
- **Kitajima M**, Oka T, Haramoto E, et al. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Lett Appl Microbiol*, **2011**, 52(2):181-4.
- **Kitajima M**, Iker BC, Pepper IL, et al. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes-identification of potential viral indicators. *Sci Tot Env*, **2014**, (488-489), p.290-296.
- **Kojima S**, Kaheyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods*, **2002**, 100(1-2): 107–14.
- **Koo HL**, Neill FH, Estes MK, et al. Noroviruses: The Most Common Pediatric Viral Enteric Pathogen at a Large University Hospital After Introduction of Rotavirus Vaccination. *J Pediatric Infect Dis Soc*, **2013**, 2(1):57-60.
- **Koopmans MP**, Bijen MH, Monroe SS, et al. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin Diag Lab Imm*, **1998**, 5(1), p.33–37.
- **Koroglu M**, Yakupogullari Y, Otlu B, et al. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *New Microbiol*, **2011**, 34(1):17-24.

- **Kosek M**, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*, **2003**, 81(3):197-204.
- **Kotloff KL**, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, **2013**, 20;382(9888):209-22.
- **Kremer JR**, Langlet J, Skrabber S, et al. Genetic diversity of noroviruses from outbreaks, sporadic cases and wastewater in Luxembourg 2008-2009. *Clin Microbiol Infect*, **2011**, 17(8), 1173-6.
- **Krishna NK**. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol*, **2005**, 18(1), p.17-26.
- **Kroneman A**, Vega E, Vennema H, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*, **2013**, 158(10):2059-68.
- **Kroneman A**, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*, **2011**, 51(2):121-25.
- **Kroneman A**, Verhoef L, Harris J, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*, **2008**, 46(9):2959-65.
- **Kukkula M**, Maunula L, Silvennoinen E, et al. Outbreak of viral Gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*, **1999**, 180(6): 1771-76.
- **Kukkula M**, Arstila P, Klossner ML, et al. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis*, **1997**, 29(4), 415–418.
- **La Frazia S**, Ciucci A, Arnoldi F, et al. Thiazolidines, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. *J Virol*, **2013**, 87(20):11096-106.
- **La Rosa G**, Fratini M, Spuri Vennarucci V, et al. GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. *New Microbiol*, **2012**, 35(1):27-34.
- **La Rosa G**, Iaconelli M, Pourshaban M. Molecular detection and genetic diversity of norovirus genogroup IV: a yearlong monitoring of sewage throughout Italy. *Arch Virol*, **2010**, 155(4):589-93.
- **La Rosa G**, Pourshaban M, Iaconelli M, et al. Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol*, **2008**, 153(11):2077-83.
- **Lai CC**, Wang YH, Wu CY, et al. A norovirus outbreak in a nursing home: Norovirus shedding time associated with age. *J Clin Virol*, **2012**, S1386-6532(12):00392-7.
- **Lamberti LM**, Fischer Walker CL, Noiman A, et al. Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health*, **2011**, 11(Suppl 3):S15.
- **Lan D**, Ji W, Shan T, et al. Molecular characterization of a porcine astrovirus strain in China. *Arch Virol*, **2011**, 156(10), p.1869–1875.
- **Le Cann P**, Ranarijaona S, Monpoeho S, et al. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol*, **2004**, 155(1), p.11–15.
- **Le Guyader F**, Dubois E, Menard D, et al. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl Environ Microbiol*, **1994**, 60(10):3665-71.
- **Lee JT**, Lee CN, Shao PL, et al. Clinical characteristics of nosocomial rotavirus infection in children in Taiwan. *J Formos Med Assoc*, **2008**, 107(10):791e7.
- **Lee R**, Lessler J, Lee R, et al. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Inf Dis*, **2013**, (13), p.446.
- **Leite JP**, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2008**, 103(8):745-53.
- **Lemey P**, Rambaut A., Drummond, A.J., et al. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol*, **2009**, 5(9):e1000520.
- **Li B**, Clark HF, Gouvea V. Nucleotide sequence of the VP4-encoding gene of an unusual human rotavirus (HCR3). *Virology*, **1993**, 196:825–830.
- **Li L**, Diab S, McGraw S, et al. Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerg Inf Dis*, **2013**, 19(9), p.1385-1392.
- **Lindell AT**, Grillner L, Svensson L, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. *J Clin Microbiol*, **2005**, 43(3):1086-92.
- **Lindesmith L**, Moe C, Marionneau S, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med*, **2003**; 9(5):548–53.
- **Linhares AC**, **Justino MC**. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. *Expert Rev Vaccines*, **2014**, 13(1):43-57.

- **Linhares** AC, Stupka JA, Ciapponi A, et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*, **2011**, 21(2):89-109.
- **Linhares** AC, Pinheiro FP, Schmetz C, et al. Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **1977**, 19, 278-279.
- **Liu** P, Chien Y, Papafragkou E, et al. Persistence of Human Noroviruses on Food Preparation Surfaces and Human Hands. *Food Environ Virol*, **2009**, 1(3-4):141-47.
- **Liu** MQ, Peng JS, Tang L, et al. Identification of new subtype of astrovirus type 3 from an infant with diarrhea in Wuhan, China. *Virology*, 2008, 375(1), p.301–306.
- **Lizasoain** A. Detección, cuantificación y caracterización molecular de astrovirus clásicos y emergentes en aguas residuales de Uruguay. Tesis de Maestría, PEDECIBA, UdelaR, Uruguay. Finalizada en Marzo de **2015**.
- **Logan** C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adeNVirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol*, **2006**, 44(9), p.3189-3195.
- **Lopez** S, **Arias** CF. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol*, **2006**, 309:39-66.
- **Lopman** B, Gastañaduy P, Park GW, et al. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr Opin Virol*, **2012**, 2(1):96-102.
- **Lopman** B. Air Sickness: Vomiting and Environmental Transmission of Norovirus on Aircraft. *Clin Infect Dis*, **2011a**, 53(6):521–22.
- **Lopman** BA, Brown DW, Koopmans M. Human Calicivirus in Europe. *J Clin Virol*, **2002**, 24(3): 137-60.
- **Lopman** BA, Reacher MH, Vipond IB, et al. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis*, **2004**, 39(3):318-24.
- **Lopman** BA, Trivedi T, Vicuña Y, et al. Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status. *J Infect Dis*, **2015**, 1;211(11):1813-21.
- **Luchs** A, Cilli A, Morillo SG, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Rotavirus genotypes circulating in Brazil, 2007-2012: implications for the vaccine program. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **2015**, 57(4):305-13.
- **Luchs** A, Cilli A, Morillo SG, et al. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol*, **2012**, 54(1):89-92.
- **Lukashov** VV, **Goudsmit** J. Evolutionary relationships among Astroviridae. *J Gen Virol*, **2002**, 83(Pt 6), p.1397–1405.
- **Madeley** CR, Cosgrove BP. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, **1975**, 2(7932), p.451-452.
- **Mandile** MG, Esteban LE, Argüelles MH, et al. Surveillance of group A Rotavirus in Buenos Aires 2008-2011, long lasting circulation of G2P[4] strains possibly linked to massive moNV alent vaccination in the region. *J Clin Virol*, **2014**, 60(3):282-9.
- **Mans** J, Netshikweta R, Magwalivha M, et al. Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. *Epidemiol Infect*, **2013**, 141(2):303-13.
- **Maranhão** AG, Vianez-Júnior JL, Benati FJ, et al. Polymorphism of rotavirus genotype G1 in Brazil: in silico analysis of variant strains circulating in Rio de Janeiro from 1996 to 2004. *Infect Genet Evol*, **2012**, 12(7):1397-404.
- **Marczinke** B, Bloys AJ, Brown TD, et al. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol*, **1994**, (68), p.5588–5595.
- **Martella** V, Decaro N, Lorusso E, et al. Genetic heterogeneity and recombination in canine noroviruses. *J Virol*, **2009**, 83(21):11391-6.
- **Martella** V, Pinto P, Tummolo F, et al. Analysis of the ORF2 of human astroviruses reveals lineage diversification, recombination and rearrangement and provides the basis for a NV el sub-classification system. *Arch Virol*, **2014**, 159(12):3185-96.
- **Martella** V, Medici MC, Terio V, et al. Lineage diversification and recombination in type-4 human astroviruses. *Inf Gen Evol*, **2013**, (20), p.330–335.
- **Martínez** N, Espul C, Cuello H, et al. Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995-1998. *J Med Virol*, **2002**, 67(2):289-98.
- **Martínez-Laso** J, Román A, Rodríguez M, et al. Diversity of the G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: cross-species transmission and inter-genotype recombination generates alleles. *J Gen Virol*, **2009**, 90(Pt 4):935-43.
- **Mathijs** E, Muylkens B, Mauroy A, et al. Experimental evidence of recombination in murine noroviruses. *J Gen Virol*, **2010**, 91, 2723–2733.

- **Matsuno** S, Hasegawa A, Kalica AR, et al. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J Gen Virol*, **1980**, 48: 253-6.
- **Matthews** JE, Dickey BW, Miller RD, et al. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect*, **2012**, 140(7):1161-72.
- **Matthijssens** J, Ciarlet M, McDonald SM, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*, **2011**, 156(8):1397-413.
- **Matthijssens** J, De Grazia S, Piessens J, et al. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Inf Gen Evol*, **2011b**, 11(6):1396-406.
- **Matthijssens** J, Heylen E, Zeller M, et al. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol*, **2010**, 27(10):2431-6.
- **Matthijssens** J & **Van Ranst** M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Cur Opin Virol*, **2012**, 2(4):426-433.
- **Matthijssens** J, Ciarlet M, Heiman E, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*, **2008**, 82(7):3204-19.
- **Matthijssens** J, Otto PH, Ciarlet M, et al. VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*, **2012**, 157(6), p.1177-1182.
- **Mattner** F, Sohr D, Heim A, et al. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect*, **2006**, 12(1):69-74.
- **Maunula** L, Kalso S, Von Bonsdorff CH, et al. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol Infect*, **2004**, 132(4):737-43.
- **Maunula** L, Roivainen M, Keränen M, et al. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveill*, **2009**, 14(49):19435.
- **McClain** B, Settembre E, Temple BR, et al. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 2010; 26;397(2):587-99.
- **McDonald** SM, Matthijssens J, McAllen JK, et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog*, **2009**, 5(10):e1000634.
- **McDonald** SM, **Patton** JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol*, **2011**, 19(3):136-44.
- **Medici** MC, Tummolo F, Albonetti V, et al. Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008-2009. *J Med Virol*, **2012**, 84(4), p.643–650.
- **Medina** SM, Gutierrez MF, Liprandi F, et al. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(9), p.3481–3483.
- **Mehnert** DU, **Stewien** KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(1):140-3.
- **Meleg** E, Jakab F, Kocsis B, et al. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *J App Microbiol*, **2006**, 101(5), 1123-1129.
- **Méndez** E, Aguirre-Crespo G, Zavala G, et al. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol*, **2007**, (81), p.10649–10658.
- **Méndez** E, **Arias** CF. *Astroviruses*. *Fields Virology*. 6<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2013**.
- **Méndez** E, Fernández-Luna T, López S, et al. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol*, **2002**, 76(16), p.7996-8002.
- **Méndez** E, Munoz-Yanez C, Sanchez-San Martin C, et al. Characterization of human astrovirus cell entry. *J Virol*, **2014**, (88), p.2452–2460.
- **Méndez** E, Salas-Ocampo E, Arias, CF. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J of Virol*, **2004a**, (78), p.8601–8608.
- **Méndez-Toss** M, Griffin DD, Calva J, et al. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol*, **2004**, 42(1), p.151–157.
- **Metcalf** TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol*, **1995**, 49:461-87.
- **Miagostovich** MP, Ferreira FFM, Guimarães FR, et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazon, Brazil. *Appl Environ Microbiol*, **2008**, 74:375-82.

- **Midthun K**, Greenberg HB, Kurtz JB, et al. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol*, **1993**, 31(4), p.955-962.
- **Miller WA**, Dreher TW, Hall TC. Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (-) sense genomic RNA. *Nature* 1985, 313, 68–70.
- **Ministerio de Turismo de Uruguay**. Principales destinos de los visitantes 2004-2014: <http://www.mintur.gub.uy/index.php/es/2014/itemlist/category/638-destinos>. Turismo Termal: <http://www.turismo.gub.uy/index.php/que-hacer/turismo-termal>. Consultado en Noviembre de **2015**.
- **Monceyron C**, Grinde B, Jonassen TO. Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch Virol*, **1997**, (142), p.699–706.
- **Montenegro S**, Pineda S, Enríquez I, et al. Norovirus detection in children with community-acquired or nosocomial diarrhea at Guillermo Grant Benavente Hospital in Concepción, Chile. *Rev Chilena Infectol*, **2014**, 31(3):298-304.
- **Morales M**, Barcena J, Ramirez MA, et al. Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-) sense genomic RNA. *J Biol Chem*, **2004**, 279, 17013–17018.
- **Morsy El-Senousy, W.**, Guix, S., Abid, I., et al. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *App ENV Microbiol*, **2007**, (73), p.164–167.
- **Mumphrey SM**, Changotra H, Moore TN, et al. Murine Norovirus 1 Infection Is Associated with Histopathological Changes in Immunocompetent Hosts, but Clinical Disease Is Prevented by STAT1-Dependent Interferon Responses. *J Virol*, **2007**, 81(7):3251-63.
- **Musalem C, Espejo RT**. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J Gen Virol*, **1985**, 66 ( Pt 12):2715-24.
- **Mustafa H**, Palombo EA, Bishop RF. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol*, **2000**, 38(3), p.1058-1062.
- **Nadan S**, Walter JE, Grabow WO, et al. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2), p.747-753.
- **Nakagomi O**, Ohshima A, Aboudy Y, et al. Molecular identification by RNA–RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J Clin Microbiol*, 1990, 28:1198-1203.
- **Nakagomi T**, Correia JB, Nakagomi O, et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol*, **2008**, 153(5):957-60.
- **Neill JD**, Mengeling WL. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res* 1988; 11(1): 59–72.
- **Neves MA**, Pinheiro HH, Silva RS, et al. High prevalence of G12P[8] rotavirus strains in Rio Branco, Acre, Western Amazon, in the post-rotavirus vaccine introduction period. *J Med Virol*. 2015 Oct 15.
- **Oishi I**, Yamazaki K, Kimoto T, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis*, **1994**, 170(2):439-43.
- **Okoh AI**, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7(6):2620-37.
- **Oliver SL**, Brown DW, Green J, et al. A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology*, 2004, 1;326(2):231-9.
- **Olives JP, Mas E**. Viral Acute Diarrhea: Clinical and Evolutive Aspects. *Arch Pediatr*, **2007**, 14(3): S152-5.
- **O'Ryan M**, Salinas AM, Mamani N, et al. Detection of Norwalk and Mexico viruses, two human Caliciviruses in stools of Chilean children. *Rev Med Chil*, **1999**, 127(5):523-31.
- **O'Ryan ML**, Lucero Y, Prado V, et al. Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort. *Pediatr Infect Dis J*, **2009**, 28(10):879-84.
- **O'Ryan ML**, Mamani N, Gaggero A, et al. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. *J Infect Dis*, **2000**, 182(5):1519-22.
- **O'Ryan ML**, Peña A, Vergara R, et al. Prospective characterization of norovirus compared with rotavirus acute diarrhea episodes in Chilean children. *Pediatr Infect Dis J*, **2010**, 29(9):855-9.
- **Pager, C.T.**, Steele, A.D. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clinical Infectious Dis*, **2002**, 35(11), p.1452-1453.

- **Palombo EA, Bishop RF.** Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol*, **1996**, 34(7), p.1750-1753.
- **Pang XL, Honma S, Nakata S, et al.** Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis*, **2000**, 181(2):S288-94.
- **Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B.** Multiplex Real Time RT-PCR for detection and quantitation of norovirus genogroups I and II inpatients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol*, **2005**, 33(2):168-71.
- **Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, et al.** Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*, **2006**, 12:304–6.
- **Parks CG, Moe CL, Rhodes D, et al.** Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol*, **1999**, 58(4):426-34.
- **Parra GI, Bok K, Martínez M, et al.** Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *J Gen Virol*, **2004**, 85(Pt 6):1713-6.
- **Parra GI.** Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *J Med Virol*, **2009**, 81(3):568-71.
- **Patel MM, Glass R, Desai R, et al.** Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure? *Lancet Infect Dis*, **2012**, 12(7):561-70.
- **Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, et al.** Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol*, **2009**, 44(1):1-8.
- **Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al.** Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, **2008**, 14(8): 1224-31.
- **PATH.** <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/country-introduction-maps-and-spreadsheet/>. Consultado en NV iembre **2015**.
- **Pativada M, Bhattacharya R, Krishnan T.** NV el human astrovirus strains showing multiple recombinations within highly conserved ORF1b detected from hospitalized acute watery diarrhea cases in Kolkata, India. *Inf Gen Evol*, **2013**, (20), p.284–291.
- **Pativada MS, Chatterjee D, Mariyappa NS, et al.** Emergence of unique variants and inter genotype recombinants of human astroviruses infecting infants, children and adults in Kolkata, India. *International J Mol Epid Gen*, **2011**, 2(3), p.228–235.
- **Patton JT.** Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med*, **2012**, 13(68):85-97.
- **Payne DC, Vinjé J, Szilagyi PG, et al.** Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N Engl J Med*, **2013**, 21; 368(12):1121-30.
- **Pérez W, Decia M, Guzzo F et al.** Gastroenteritis aguda en lactantes: Admisión en el Centro Hospitalario Pereira Rossell 2006-2007. *Arch Pediatr Urug*, **2011**, 82(1): 4-9.
- **Pérez W, Melogno A, Píriz M, et al.** Diarrea aguda infantil: Admisión hospitalaria en menores de tres años. Año 2005. *Arch Pediatr Urug*, **2007**, 78(2): 94-98.
- **Pesavento JB, Lawton JA, Estes ME, et al.** The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 13;98(4):1381-6.
- **Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, et al.** Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol*, **2007a**, 1(18):10188-94.
- **Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, et al.** Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect Genet Evol*, **2007b**, 7, 656-663.
- **Phan TG, Nordgren J, Ouermi D, et al.** New astrovirus in human feces from Burkina Faso. *J Clin Virol*, **2014**, 60(2), p.161-164.
- **Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, et al.** Risk factors for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community. *Epidemiol Infect*, **2010**, 139(11): 1676-86.
- **Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, et al; MAL-ED Network Investigators.** Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health*, **2015**, 3(9):e564-75.
- **Pletneva MA, SosNV tsev SV, Green KY.** The genome of Hawaii virus and its relationship with other members of the Caliciviridae. *Vir Gen*, **2001**, 23, 5–16.
- **Prado T, Silva DM, Guilayn WC, et al.** Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res*, **2011**, 45(3):1287-97.
- **Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, et al.** X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, **1999**, 8; 286(5438):287-90.
- **Prez VE, Gil PI, Temprana CF, et al.** Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Sci Total Environ*, **2015**, 15;538:220-9.
- **Pujol FH, Vásquez G, Rojas AM, et al.** Norwalk virus infection in Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol*, **1998**, 92(2):205-11.

- **Putzker** M, Sauer H, Kirchner G, et al. Community acquired diarrhea—the incidence of Astrovirus infections in Germany. *Clin Lab*, **2000**, 46(5-6), p.269–273.
- **Quan** PL, Wagner TA, Briese T, et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Inf Dis*, **2010**, 16(6), p.918-925.
- **Raboni** SM, Damasio GA, Ferreira CE, et al. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalized children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2014**, 109(4):428-35.
- **Rahman** M, Matthijnsens J, Yang X, et al. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol*, **2007**, 81(5):2382-90.
- **Rajko-Nenow** P, Waters A, Keaveney S, et al. Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland in 2010. *Appl Environ Microbiol*, **2013**, 79(8), 2578-87.
- **Ramani** S, Atmar RL, Estes MK. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr Opin Gastroenterol*, **2014**, 30(1):25-33.
- **Ramani** S, Sankaran P, Arumugam R, et al. Comparison of viral load and duration of virus shedding in symptomatic and asymptomatic neonatal rotavirus infections. *J Med Virol*, **2010**, 82(10):1803-7.
- **Ramirez** Y, Pastorini J, Russi J, et al. Enfermedad diarreica aguda: Características de la población asistida en el CASMU. Abril 1997 - Abril 1998. April 1997–April 1998. *Arch Pediatr Urug*, **2001**, 72:110–115.
- **Resque** HR, Munford V, Castilho JG, et al. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2007**, 102(8), Diciembre, p.969-974.
- **Rhinehart** E, Walker S, Murphy D, et al. Frequency of outbreak investigations in US hospitals: results of a national survey of infection preventionists. *Am J Infect Control*, **2012**, 40(1):2-8.
- **Ribeiro** LR, Giuberti RS, Barreira DM, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2008**, 103(2):201-06.
- **Ribeiro** L, Burjel L, Thomas CE, et al. Electroferotipos e incidencia de Rotavirus en la ciudad de Paysandú, Uruguay. *Comunicación Breve. Acta Bioq Clín Lat*, **1999**, 32(4), p.525-528.
- **Richards** AF, Lopman B, Gunn A, et al. Evaluation of commercial Elisa for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol*, **2003**, 26(1):109-15.
- **Rigotto** C, Victoria M, Moresco V, et al. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. *J Appl Microbiol*, **2010**, 109:1979-87.
- **Risco** C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, et al. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol*, **1995**, (76), p.2075–2080.
- **Rivera** FP, Ochoa TJ, Ruiz J, et al. Norovirus prevalence in 'pathogen negative' gastroenteritis in children from periurban areas in Lima, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **2011**, 105(12):734-6.
- **Rivera** R, Nollens HH, Venn-Watson S, et al. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *J Gen Virol*, **2010**, 91(Pt 1), p.166-173.
- **Robertson** MP, Igel H, Baertsch R, et al. The structure of a rigorously conserved RNA element within the SARS virus genome. *PLoS Biology*, **2005**, 3:e5.
- **Rockx** B, De Wit M, Vennema H, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*, **2002**, 35(3):246–53.
- **Rodríguez-Díaz** J, Querales L, Caraballo L, et al. Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Appl Environ Microbiol*, **2009**, 75(2):387-94.
- **Rodríguez-Guillén** L, Vizzi E, Alcalá AC, et al. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol*, **2005**, 33(2):104-9.
- **Rose** TL, Marques da Silva MF, Gómez MM, Resque HR, Ichihara MY, Volotão Ede M, Leite JP. Evidence of vaccine-related reassortment of rotavirus, Brazil, 2008-2010. *Emerg Infect Dis*, **2013**, 19(11):1843-6.
- **Rossignol** JF, El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther*, **2006**, 24(10):1423-30.
- **Rovida** F, Campanini G, Sarasini A, et al. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diag Microbiol Inf Dis*, **2013**, 75(1), p.110–111.
- **Royuela** E, Negredo, A, Sanchez-Fauquier A. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *J Virol Meth*, **2006**, 133(1), p.14–19.
- **Ruggeri** FM, Bonomo P, Ianiro G, et al. Rotavirus genotypes in sewage treatment plants and in children hospitalized with acute diarrhea in Italy in 2010 and 2011. *Appl Environ Microbiol*, **2015**, 81(1):241-9.
- **Ruiz-Palacios** GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, et al; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, **2006**, 354(1):11-22.

- **Saito** M, Goel-Apaza S, Espetia S, et al; Norovirus Working Group in Peru. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Periurban community. *Clin Infect Dis*, **2014**, 58(4):483-91.
- **Santos** N, **Hoshino** Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*, **2005**, 15(1):29-56.
- **Santosham** M, Chandran A, Fitzwater S, et al. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. *Lancet*, **2010**, 3;376(9734):63-7.
- **Sarvikivi** E, Roivainen M, Maunula L, et al. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiol Infect*, **2012**, 140(2):260-67.
- **Sattar** SA. Microbicides and the environmental control of nosocomial viral infections. *J Hosp Infect*, **2004**, 56 Suppl 2:S64-9.
- **Schlindwein** AD, Rigotto C, Simões CM, et al. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Sci Technol*, **2010**, 61(2):537-44.
- **Schmid** D, Lederer I, Schreier E, et al. A Foodborne Norovirus Outbreak Due To Manually Prepared Salad, Austria 2006. *Infection*, **2007**, 35 (4), 232-239.
- **Schnepf** N, Deback C, Dehee A, et al. Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *J Virol*, **2008**, 82(7):3689-96.
- **Schreiber** DS, Blacklow NR, Trier JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med*, **1973**, 288(25): 1318–23.
- **Schreiber** DS, Blacklow NR, Trier JS. The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis*, **1974**, 129(6): 705–08.
- **Sebire** NJ, Malone M, Shah N, et al. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Path*, **2004**, 57(9), p.1001-1003.
- **Seitz** SR, Leon JS, Schwab KJ, et al. Norovirus human infectivity and persistence in water. *Appl Environ Microbiol*, **2011**, 77(19): 6884-88.
- **Shen** Z, He H, Wu Y, et al. Cyclosporin A inhibits rotavirus replication and restores interferon-beta signaling pathway in vitro and in vivo. *PLoS One*, **2013**, 21;8(8):e71815.
- **Shimizu** M, Shirai J, Narita M, et al. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J Clin Microbiol*, **1990**, 28(2), p.201-206.
- **Siebenga** JJ, Vennema H, Renckens B, et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol*, **2007**, 81(18):9932-41.
- **Siebenga** JJ, Vennema H, Zheng DP, et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis*, **2009**, 200(5):802-12.
- **Sinclair** RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol*, **2009**, 1;107(6):1769-80.
- **Soares** CC, Santos N, Beard RS, et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis*, **2007**, 13(8):1244-46.
- **SosNV tsev** SV, Prikhod'ko EA, Belliot G, et al. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res*, **2003**, 94(1):1–10.
- **Souza** M, Azevedo MS, Jung K, et al. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol*, **2008**, 82(4):1777-86.
- **Staat** MA, Azimi PH, Berke T, et al. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J*, **2002**, 21(3):221-7.
- **Steinmann** J. Detection of rotavirus in sewage. *Appl Environ Microbiol*, **1981**, 41(4):1043-5.
- **Strain** E, Kelley LA, Schultz-Cherry S, et al. Genomic analysis of closely related astroviruses. *Journal of Virology*, **2008**, (82), p.5099–5103.
- **Symonds** EM, Verbyla ME, Lukasik JO, et al. A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Res*, **2014**, 15;65:257-70.
- **Tacket** CO, Sztein MB, Losonsky GA, et al. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol*, **2003**, 108(3):241-7.
- **Tan** M, Jiang X. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Rev Mol Med*, **2007**, 9(19):1-22.
- **Tan** M, Jiang X. The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms a Subviral Particle That Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *J Virol*, **2005**, 79(22):14017–30.
- **Taniguchi** K & **Urasawa** S. Diversity in rotavirus genomes. *Semin Virol*, **1995**, 6, 123 - 131.
- **Tate** JE, Patel MM, Cortese MM, et al. Remaining issues and challenges for rotavirus vaccine in preventing global childhood diarrheal morbidity and mortality. *Expert Rev Vaccines*, **2012**, 11(2):211-20.

- **Teixeira** DM, Hernandez JM, Silva LD, et al. Occurrence of Norovirus GIV in Environmental Water Samples from Belém City, Amazon Region, Brazil. *Food Environ Virol*, 2015, NV 4. [*Epub ahead of print*].
- **Teran** CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int J Infect Dis*, 2009, 13(4):518-23.
- **Teunis** PF, Moe CL, Liu P, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol*, 2008, 80(8):1468-76.
- **Thongprachum** A, Chan-it W, Khamrin P, et al. Reemergence of new variant G3 rotavirus in Japanese pediatric patients, 2009-2011. *Infect Genet Evol*, 2013, 13:168-74.
- **Thorne** LG, **Goodfellow** IG. Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol*, 2014, (95), p.278-291.
- **Thornley** CN, Emslie NA, Sprott TW, et al. Recurring norovirus transmission on an airplane. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(6):521-26.
- **Thouillot** F, Delhostal C, Edel C, et al. Gastroenteritis outbreaks in elderly homes in the east of France during winter 2009/10: aetiology research for a series of 37 outbreaks. *Euro Surveill*, 2012, 17(9):20103.
- **Timenetsky** MC, Gouvea V, Santos N, et al. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. Study Group on Diarrhea of the Instituto Adolfo Lutz. *J Diarrhoeal Dis Res*, 1996, 14:71-74.
- **Torres** ME, Pérez MC, Schelotto F, et al. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(6):2134-9.
- **Trask** SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 23;10(3):165-77.
- **Treanor** JJ, Atmar RL, Frey SE, et al. A NV el intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate--reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. *J Infect Dis*, 2014, 1;210(11):1763-71.
- **Trivedi** TK, DeSalvo T, Lee L, et al. Hospitalizations and mortality associated with norovirus outbreaks in nursing homes, 2009-2010. *JAMA*, 2012, 308(16):1668-75.
- **Troeger** H, Loddenkemper C, Schneider T, et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut*, 2009, 58(8):1070-77.
- **Trojnar** E, Sachsenröder J, Twardziok S, et al. Identification of an avian group A rotavirus containing a NV el VP4 gene of close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 1):136-42.
- **Tse** H, Lau SK, Chan WM, et al. Complete genome sequences of NV el canine noroviruses in Hong Kong. *J Virol*, 2012, 86(17):9531-2.
- **Tung-Thompson** G, Libera DA, Koch KL, et al. Aerosolization of a Human Norovirus Surrogate, Bacteriophage MS2, during Simulated Vomiting. *PLoS One*, 2015, 19;10(8):e0134277.
- Ulloa, J.C., Gutierrez, M.F. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. *Canad J Microbiol*, 2010, 56(7), p.569-577.
- **van Hemert** FJ, Berkhout B, Lukashov VV. Host-related nucleotide composition and codon usage as driving forces in the recent evolution of the Astroviridae. *Virology*, 2007a, 361(2), p.447-454.
- **van Hemert** FJ, Lukashov VV, Berkhout B. Different rates of (non-)synonymous mutations in astrovirus genes; correlation with gene function. *Virology J*, 2007b, 4(25).
- **Varela** G, Batthyány L, Bianco MN, et al. Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in Uruguay. *Int J Microbiol*, 2015, 592953.
- **Verhoef** L, Vennema H, van Pelt W, et al. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(4):617-24.
- **Verma** H, Chitambar SD, Gopalkrishna V. Astrovirus associated acute gastroenteritis in western India: predominance of dual serotype strains. *Inf Gen Evol*, 2010, 10(4), p.575-579.
- **Verreault** D, Moineau S, Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(3):413-44.
- **Vesikari** T, Matson DO, Dennehy P, et al; Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*, 2006, 5;354(1):23-33.
- **Victoria** M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, et al. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J*, 2007, 26(7):602-6.
- **Victoria** M, Guimarães FR, Fumian TM, et al. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*, 2010b, 8(1):158-65.

- **Victoria** M, Miagostovich MP, Ferreira MS, et al. Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. *Inf Gen Evol*, **2009**, 9(5):927-32.
- **Victoria** M, Rigotto C, Moresco V, et al. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. *J Appl Microbiol*, **2010a**, 109(1):231-8.
- **Victoria** M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, et al. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol*, **2007**, 79(7), p.939-944.
- **Vidal** R, Roessler P, Solari V, et al. NV el recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J Clin Microbiol*, **2006**, 44(6):2271-5.
- **Vidal** R, Solari V, Mamani N, et al. Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. *Emerg Infect Dis*, **2005**, 11(7):1134-37.
- **Vieira** CB, Mendes ACO, Guimarães FR, et al. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2012**, 107:778-84.
- **Vietto** A, Monteverde N, Pinchak C. Características clínicas y etiológicas de la enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años hospitalizados en el Hospital Central de las Fuerzas Armadas (2004-2006). *Arch Pediatr Urug*, **2009**, 80(1): 17-22.
- **Villena** C, El-Senousy WM, Abad FX, et al. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl Environ Microbiol*, **2003b**, 69(7):3919-23.
- **Villena** C, Gabrieli R, Pintó RM, et al. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiol Infect*, **2003a**, 131(3):1105-10.
- **Vinje** J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Meth*, **2004**, 116(2):109-17.
- **Vinje** J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol*, **2000**, 38(7): 2595–601.
- **Vinje** J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*, **2015**, 53(2):373-81.
- **Vivancos** R, Shroufi A, Sillis M, et al. Food related norovirus outbreak among people attending two barbecues: epidemiological, virological and environmental investigation. *Int J Infect Dis*, **2009**, 13(5): 629-35.
- **Wadl** M, Scherer K, Nielsen S, et al. Food-borne norovirus outbreak at a military base, Germany 2009. *BMC Infect Dis*, **2010**, 10:30.
- **Walker** CL, Rudan I, Liu ., et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet*, **2013**, 381: 1405–16.
- **Walter** JE, Briggs J, Guerrero ML, et al. Molecular characterization of a NV el recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol*, **2001**, 146(12), p.2357-2367.
- **Wang** QH, Kakizawa J, Wen LY, et al. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J Med Virol*, **2001**, (64), p.245–255.
- **Westhoff** TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, et al. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, **2009**, 24(3):1051–1053.
- **White** PA. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect*, **2014**, 20(8):741-5.
- **WHO**. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/08.17, **2009**. [www.who.int/vaccines-documents/](http://www.who.int/vaccines-documents/).
- **Widdowson** MA, Cramer EH, Hadley L, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus-United States, 2002. *J Infect Dis*, **2004**, 190(1):27-36.
- **Wikswø** ME, Cortes J, Hall AJ, et al. Disease transmission and passenger behaviors during a high morbidity Norovirus outbreak on a cruise ship, January 2009. *Clin Infect Dis*, **2011**, 52(9):1116-22.
- **Willcocks** MM, Ashton N, Kurtz JB, et al. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J Virol*, **1994**, 68(9), p.6057–6058.
- **Wolfaardt** M, Kiulia NM, Mwenda JM, et al. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, **2011**, (49), p.728–731.
- **Woods** RJ. Intrasegmental recombination does not contribute to the long-term evolution of group A rotavirus. *Infect Genet Evol*, **2015**, 32:354-60.
- **Wunderli** W, Meerbach A, Gungor T, et al. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One*, **2011**, 6:e27483.
- **Xavier** Mda P, Carvalho Costa FA, Rocha MS, et al. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The First Report of MLB1 Astrovirus. *PLoS One*, **2015**, 14;10(8):e0135687.

- **Xavier** MP, Oliveira SA, Ferreira MS, et al. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res*, **2009**, 42(5):438–44.
- **Xiao** C-T, Giménez-Lirola LG, Gerber PF, et al. Identification and characterization of NV el porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *J Gen Virol*, **2013**, 94(Pt 3), p.570–582.
- **Yap** J, Qadir A, Liu I, et al. Outbreak of acute norovirus gastroenteritis in a military facility in Singapore: a public health perspective. *Singapore Med J*, **2012**, 53(4):249-54.
- **Yen** C, Tate JE, Patel MN, et al. Rotavirus vaccines: Update on global impact and future priorities. *Human Vaccines*, **2011**, 12: 1282-1290.
- **Yori** PP, Schwab K, Gilman RH, et al. Norovirus highly prevalent cause of endemic acute diarrhea in children in the peruvian Amazon. *Pediatr Infect Dis J*, **2009**, 28(9):844-7.
- **Youngs** ER, **Pugh** SF. Rotavirus in vomit. *J Infect*, **1989**, 18:99.
- **Yu** JH, Kim NY, Kon YJ, et al. Epidemiology of foodborne Norovirus outbreak in Incheon, Korea. *J Korean Med Sci*, **2010**, 25(8):1128-33.
- **Zahorsky** J. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr*, **1929**, 46:391–95.
- **Zeng** SQ, Halkosalo A, Salminen M, et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, 2008, 153(2), NV iembre, p.238-2340.
- **Zheng** DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, **2006**, 346(2):312–23.
- **Zhou** N, Lin X, Wang S, et al. Environmental surveillance for human astrovirus in Shandong province, China in 2013. *Scientific Reports*, **2014**, 4(7539).
- **Zintz** C, Bok K, Parada E, et al. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Inf Gen Evol*, **2005**, 5(3):281–90.

## 9 – ANEXOS: ARTÍCULOS RELACIONADOS AL PRESENTE TRABAJO

En esta sección se coloca las referencias bibliográficas a los artículos científicos publicados por nuestro grupo durante el periodo en el que se llevo a cabo el presente trabajo, pero que no fueron generados en el marco de la presente tesis. Sin embargo, estos artículos se encuentran vinculados a la temática de esta tesis, y, además, he participado de las investigaciones que deribararon en los mismos.

### 9.1 – Anexo 1

- Lizasoain A, **Tort LF**, García M, Gómez MM, Cristina J, Leite JP, Miagostovich MP, Victoria M, Colina R. Environmental Assessment of Classical Human Astrovirus in Uruguay. *Food Environ Virol*, 2015, Feb 14. doi: 10.1007/s12560-015-9186-4 [*Epub ahead of print*]

### 9.2 – Anexo 2

- Lizasoain A, **Tort LF**, García M, Gómez MM, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R, Victoria M. Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. *J Appl Microbiol*, 2015, Sep; 119(3):859-67. doi: 10.1111/jam.12856.

### **9.3 – Anexo 3**

- Lizasoain A, **Tort LF**, García M, Gómez MM, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Berois M, Colina R, Victoria M. Sewage surveillance reveals the presence of canine GVII norovirus and canine astrovirus in Uruguay. Arch Virol, 2015, NV ; 160(11):2839-43. doi: 10.1007/s00705-015-2571-3.

### **9.4 – Anexo 4**

- Burutarán L, Lizasoain A, García M, **Tort LF**, Colina R, Victoria M. Detection and Molecular Characterization of Aichivirus 1 in Wastewater Samples from Uruguay. Food Environ Virol, 2015, Oct 11. [*Epub ahead of print*]