



CENUR Litoral Norte, Universidad de la República
Departamento de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Virología Molecular
PEDECIBA Biología
Tesis de Doctorado

**Diversidad genética y análisis de riesgo microbiológico de
virus gastroentéricos en aguas residuales y superficiales de
ciudades ribereñas del Río Uruguay**

Autora: MSc. Viviana Bortagaray

Orientador: Dr. Matías Victoria
Coorientadores: Dr. Rodney Colina
Dra. Daiana Mir

Salto, Uruguay
12 de setiembre de 2025

Tesis presentada al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas como
requisito necesario para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas

Integrantes del tribunal:

Presidente: Dr. Juan Cristina _ _ _ _ _

Vocales: Dra. Natalia Echeverria _ _ _ _ _

_ Dra. Natalia Ramos _ _ _ _ _

A mis padres

A Pedro

A mis hijos

"Si no puedes volar, corre; si no puedes correr, camina; si no puedes caminar, gatea, pero sigue avanzando hacia tu meta".

Martin Luther King.

Agradecimientos

A mis padres, por ser un ejemplo de esfuerzo constante y por brindarme su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A Pedro, mi compañero de ruta, cuya presencia hace que todo esto sea posible.

A Matías Victoria, quien ha sido mucho más que un tutor durante todos estos años, desde mi maestría. Gracias por convertirte en un amigo, por compartir conmigo tu conocimiento y experiencias, y por las incontables horas de cálculos frente al pizarrón.

A Rodney, por abrirme las puertas del Laboratorio y apoyarme en cada iniciativa, desde congresos hasta proyectos. Tus palabras de aliento han sido invaluable.

A Daiana Mir, por tu papel como co-orientadora y por tu apoyo incondicional en cada duda y desafío que enfrenté.

A Mati C., Andrés, Fernando, Matias Salvo, Majo, Leticia y Marcos, compañeros y amigos del Laboratorio de Virología Molecular de Salto, quienes han sido parte fundamental de este camino.

A Pablo Gamazo y Sebastián Castro, por su imprescindible apoyo matemático, un pilar fundamental en el desarrollo de esta tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, por hacer posible mi formación como investigadora, financiando los estudios a través del proyecto asociado a esta tesis. Su apoyo ha sido crucial para mi desarrollo a nivel de posgrado.

Al Sistema Nacional de Investigadores, por su respaldo en mi trayectoria académica.

A PEDECIBA, por permitirme formar parte de sus programas de posgrados y brindarme la oportunidad no solo de realizar mi maestría, sino también de culminar mi doctorado.

A la Universidad de la República, y especialmente al CENUR Litoral Norte, por proporcionar las condiciones necesarias para llevar a cabo los experimentos que hicieron posible los resultados presentados en esta tesis.

Índice

Sección I – Introducción.....	8
I.1 Virología Ambiental	8
I.2 Introducción a los Virus Gastroentéricos	11
I.3 Características de los Virus Gastroentéricos relevantes en este trabajo.....	13
I.3.1 Astrovirus	13
I.3.2 Norovirus	16
I.3.3 Rotavirus	19
I.4 Vigilancia Molecular de los Virus Gastroentéricos en ambiente.....	23
I.5 Análisis Cuantitativo de Riesgo Microbiológico	27
Sección II – Relevancia.....	31
Sección III – Hipótesis	33
Sección IV – Objetivos.....	34
IV.1 Objetivo General.....	34
IV.2 Objetivos Específicos.....	34
Sección V – Resultados	35
Capítulo I. “Caracterización molecular de virus gastroentéricos en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay”	36
Capítulo II. “Estudio de la circulación de diferentes estirpes de virus gastroentéricos en poblaciones ribereñas del Río Uruguay mediante secuenciación de nueva generación”	50
Capítulo III. “Comparación del riesgo de infección por rotavirus y astrovirus humano para actividades recreativas de nado y pesca en el Río Uruguay”	70
Sección VI – Discusión globalizadora	83
Sección VII- Conclusiones	95
Sección VIII – Perspectivas.....	97
Sección IX- Bibliografía.....	98

Resumen

Los virus gastroentéricos afectan a la salud de todos los grupos etarios de humanos principalmente a niños y ancianos en todo el mundo. Se diseminan en diferentes cuerpos de aguas por medio de la contaminación con aguas residuales ocasionando brotes de gastroenteritis en la población que utiliza dicho recurso con diferentes fines. El objetivo de esta tesis fue estudiar el impacto de Rotavirus del grupo A (RVA), Norovirus (NoV) y Astrovirus humano (HAstV) sobre la salud de la población ribereña del Río Uruguay, mediante su caracterización molecular (técnicas de Sanger y secuenciación de nueva generación, *Next-Generation Sequencing* [NGS]) y la realización de análisis de riesgo microbiológico cuantitativo (*Quantitative Microbial Risk Assessment* [QMRA]). Para el QMRA se tomaron muestras mensuales de agua superficial del Río Uruguay en la ciudad de Fray Bentos y en el balneario Las Cañas. Para la caracterización molecular se tomaron muestras mensuales de aguas residuales de las ciudades de Bella Unión, Salto y Fray Bentos. En las aguas residuales, RVA fue el más frecuentemente detectado (50%), seguido de HAstV (39%), NoV GII (36%) y NoV GI (25%). Por medio de la metodología de Sanger y NGS las cepas de RVA se caracterizaron como G3 y P[8] según VP7 y VP4, respectivamente. En la secuenciación por Sanger, para NoV se detectaron e identificaron los genotipos GI.2, GI.3, GI.5, GI.6, GI.7, GI.12, mientras que para NoV GII los genotipos caracterizados filogenéticamente fueron GII.2, GII.4 y GII.6 y solo se encontró un genotipo de HAstV (MLB1). En la secuenciación por NGS para NoV GII se logró identificar la variante GII.4 Sydney 2012 además de los genotipos ya caracterizados por Sanger. Para HAstV, los genotipos observados fueron MLB1, MLB2 y HAstV-1. Por medio del QMRA se determinó que la probabilidad de infección por RVA para los pescadores varió entre 0% y 65% y para los nadadores entre 0% y 50% (<18 años) y entre 0% y 38% (>18 años). Para HAstV, la probabilidad de la infección para los pescadores varió entre 0% y 45% y para los nadadores entre 0 y 38% (<18 años) y entre 0 y 18% (>18 años). Este trabajo reveló una gran diversidad de genotipos de virus gastroentéricos que circulan en ciudades ribereñas del río Uruguay, así como un considerable riesgo de infección asociado a diferentes actividades recreativas que allí se realizan.

Sección I - Introducción

I.1 Virología Ambiental

La virología ambiental es la disciplina que estudia la presencia, el comportamiento y el impacto de los virus en distintos componentes del medio ambiente, como son el agua, el aire, el suelo y diferentes superficies, estableciendo su relación con la salud pública. Esta área de estudio tiene como objetivo comprender la dinámica de los virus en el medio para poder así diseñar estrategias efectivas de mitigación y prevención de brotes infecciosos con el objetivo de preservar la salud de los habitantes (Gerba et al., 1978; 2007). Comprende un amplio campo de estudio centrado en el estudio de los diferentes virus e integrado por diversos procesos y objetos que están altamente relacionados con políticas públicas específicas, tales como la implementación de redes de saneamiento, el uso y manejo de los recursos hídricos y costeros, la salud y la vigilancia epidemiológica. (Prado et al., 2014).

Aunque los virus están presentes en todo el ambiente, como se mencionó anteriormente, la mayoría de los estudios de investigación se centran en el medio acuático (principalmente aguas superficiales y aguas residuales), siendo la salud pública el principal factor motivador detrás de todos estos. Los brotes relacionados a dichos microorganismos surgen en su mayoría debido a la ingestión de agua contaminada con virus patógenos humanos (p. ej., enterovirus, adenovirus, norovirus, rotavirus y hepatitis). Dicha agua puede ser de uso recreativo (ríos, lagunas), utilizada para riego de cultivos o para consumo humano (Gensberger et al., 2013).

Los ecosistemas acuáticos de agua dulce, como lagos, ríos, arroyos y aguas subterráneas constituyen en sí mismo las fuentes de agua potable en todos los países del mundo. Sin embargo, en las últimas décadas, el crecimiento de la población mundial y la urbanización han generado una enorme presión sobre estos recursos hídricos destinados al consumo humano y actividades recreativas. La contaminación provocada por vertidos de aguas residuales

contaminadas con virus, sustancias químicas tóxicas, y nutrientes, junto con las floraciones de algas nocivas resultantes, puede comprometer la calidad del agua, volviéndola inadecuada tanto para beber como para su uso recreativo (Tan et al., 2015).

Las enfermedades que están relacionadas con el agua están asociadas con la exposición a ésta de diversas maneras que no incluyen solo a las utilizadas para consumo o de uso recreativo, sino también a aquellas utilizadas con fines agrícolas como riego de cultivos y procesamiento de alimentos, lo que eventualmente resulta en brotes de gastroenteritis transmitidos por alimentos (Bosch et al., 2008). Estas enfermedades transmitidas por el agua se deben con mayor frecuencia a virus que presentan un origen fecal humano debido a su capacidad de persistir durante un mayor tiempo en el agua superficial y en el ambiente respecto a las bacterias (Gersberg et al. 2006). El agua recreativa es la principal causa atribuible a las enfermedades gastrointestinales agudas durante las temporadas de recreación (Sanborn & Takaro, 2013).

Cabe destacar que se ha evidenciado que una red de saneamiento funcionando de manera inadecuado está directamente asociada con un incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas virales, con énfasis particular en la diarrea infantil. (Prado et al., 2014)

Las fuentes de infección suelen estar relacionadas, no solo con la vía fecal humana, sino también con la animal. Sin embargo, aunque los niveles de contaminación son altos en la fuente (hasta 10^{10} partículas por gramo de heces), los virus se diluyen en grandes volúmenes de agua a concentraciones bajas (tan solo 1-10 partículas virales infecciosas por litro), siendo estas concentraciones suficientes para provocar infecciones y brotes (Foing et al., 2005; Julian et al., 2012). En pacientes con gastroenteritis o hepatitis, los virus son excretados en concentraciones de entre 10^5 y 10^{13} partículas virales por gramo de heces, haciendo que estén presentes en altas concentraciones en las aguas residuales, principalmente en regiones endémicas o cuando ocurren brotes en la comunidad. El saneamiento básico juega un papel fundamental en el control de la propagación de estos virus en el ambiente, reduciendo considerablemente el riesgo de transmisión hídrica (Prado et al., 2014)

Debido a la gran importancia para la salud humana, es que estudios sobre contaminación del medio acuático con virus entéricos humanos han sido ampliamente descritos en la literatura, particularmente en aguas residuales, aguas subterráneas, aguas superficiales y sedimentos (Cioffi et al., 2020).

Desde la pandemia de COVID-19, la red de vigilancia de aguas residuales ha mostrado un notable potencial para monitorear diferentes virus infecciosos. Esta herramienta se ha implementado recientemente como un sistema de alerta temprana para rastrear la (re)emergencia de diversos patógenos, detectar brotes comunitarios y caracterizar las cepas en circulación, todo ello sin necesidad de depender de información proveniente de pacientes, la cual es muchas veces difícil de obtener, además también de que en esta información no se tienen en cuenta a las personas que cursan la infección de manera asintomática que si bien excretan el virus, no asisten al médico (Polo et al., 2020). A través de este sistema, en Hong Kong, se registraron altas concentraciones de norovirus en las aguas residuales, logrando además la detección sensible de virus emergentes como la viruela del mono (mpox), incluso en zonas con baja prevalencia. Esto confirma que la vigilancia mediante el análisis de aguas residuales es una herramienta eficaz y confiable para detectar, caracterizar y elaborar acciones a fin de controlar las enfermedades infecciosas. (Zheng et al., 2024). En un trabajo realizado en Caracas, Venezuela durante 12 meses se implementó la herramienta de vigilancia epidemiológica a través de las aguas residuales, donde se pudo observar la circulación de diversos virus gastroentéricos como rotavirus, adenovirus, calicivirus, enterovirus y coxsackievirus, reflejando la transmisión dentro de la población y la persistencia de un riesgo potencial para la salud pública que necesita ser adecuadamente monitoreado (Zamora-Figueroa et al., 2024). En California, EEUU, se llevó a cabo un análisis exhaustivo entre datos obtenidos de vigilancia de NoVGII a través de una red de monitoreo de norovirus por aguas residuales y datos clínicos, lo que evidenció una relación directa entre los datos clínicos y los observados mediante las aguas residuales los que llevaron a acciones directas en salud pública, incluyendo la orientación de investigaciones de brotes locales (Yu At, et al., 2024).

I.2 Introducción a los Virus gastroentéricos

Los virus gastroentéricos conforman un grupo de virus que infectan y eventualmente replican en el tracto gastrointestinal del hospedero causando diferentes enfermedades tales como gastroenteritis, encefalitis o hepatitis virales (Estes & Greenberg 2013). En un trabajo realizado por Bao y colaboradores (2023) en niños con diarrea en Shanghai y Taizhou (China) observaron que el viroma de los pacientes con enfermedades diarreicas estaba dominado principalmente por las familias *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae* y *Picornaviridae*, conocidos como virus gastroentéricos (Bao et al., 2023). Las infecciones virales causadas por dichos virus contribuyen significativamente a la carga global de las enfermedades diarreicas, las cuales son la tercer causa de muerte en niños menores de 5 años resultando en aproximadamente 444.000 muertes anuales a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2024).

Diversos estudios han evidenciado la presencia de estos virus en altas frecuencias en distintos cuerpos de agua, especialmente en aquellos ubicados en zonas urbanas, como ríos, arroyos y lagos, siendo esta situación más común en países en desarrollo. En el caso particular de las aguas residuales, la detección de estos virus se remonta a más de tres décadas mediante metodologías clásicas de virología. A partir de los años 2000, el empleo de técnicas moleculares se ha extendido ampliamente, no solo para su identificación y cuantificación, sino también para el análisis de genotipos y variantes genéticas virales presentes en esta matriz. Dichos estudios han permitido obtener una visión más clara de la circulación de estas variantes en la población local, evaluar el impacto de la contaminación en diferentes cuerpos de agua y, además, aportar información valiosa que puede contribuir al desarrollo de vacunas (Tubatsi et al., 2022). Estos estudios han revelado la presencia de estos virus en altas frecuencias (principalmente en los meses fríos del año en climas templados) en las aguas residuales en elevadas concentraciones y con muchas estirpes de diferentes genotipos en constante co-circulación (da Silva et al., 2016; Victoria et al., 2016).

Las infecciones por virus gastroentéricos ocasionalmente resultan en casos asintomáticos que generalmente no son identificados mediante la vigilancia

clínica, pero que cursan la infección y excretan el virus pudiendo generar brotes. La presencia de estos virus en ambientes acuáticos, nos indica la presencia de individuos infectados, incluyendo a los asintomáticos o con síntomas leves que no consultan al médico por lo que no quedan registrados, pero si se puede inferir su circulación o predecir brotes mediante el monitoreo a través de las aguas residuales. Por lo tanto, la investigación y detección de estos en el agua ambiental tiene importancia desde el punto de vista de la epidemiología y la gestión de los riesgos a la salud pública (Hata et al 2018), ya que se obtiene un panorama más completo de lo que realmente sucede en las poblaciones abarcando tanto a individuos con síntomas como a los asintomáticos.

El término “virus entéricos” o de diseminación entérica representa a todos los grupos virales presentes en el tracto gastrointestinal humano y que, tras la transmisión fecal-oral, pueden causar infecciones en individuos susceptibles (Prado et al., 2014). Debido a que son excretados en la materia fecal de los individuos infectados, con frecuencia contaminan diferentes cuerpos de agua, tales como ríos y lagos, a través del vertido de las aguas residuales contaminadas. Dentro de este grupo de virus encontramos a los Rotavirus, Norovirus y Astrovirus (estudiados en este trabajo), considerados como los principales virus responsables de las gastroenteritis en humanos en todo el mundo además de los adenovirus, sapovirus, y algunos enterovirus (Robilotti et al. 2015, Vu et al. 2017). Estos presentan ciertas características biológicas y fisico-químicas que los hace altamente resistentes a condiciones climáticas desfavorables y también ambientales (PH extremos o desecación) debido a su robusta cubierta proteica y que no poseen envoltura lipídica, lo que les permite persistir en las diferentes matrices ambientales en forma activa por largos períodos de tiempo (Prado et al., 2014). A pesar de su supervivencia fuera del huésped, favorecida por su estabilidad y capacidad de resistencia a la degradación en el ambiente, no se multiplican extracelularmente y habitualmente se produce un efecto de “dilución ambiental” una vez que han sido excretados (Straub et al., 2003). El número estimado de partículas víricas en el agua contaminada es de 1-10 partículas por cada 100 ml. Teniendo en cuenta la baja dosis infectiva de estos virus, la existencia de niveles reducidos de contaminación incluso por debajo del límite de detección pueden ser suficientes para causar enfermedad (Bellido Blasco 2006).

I.3 Características de los virus gastroentéricos relevantes en este trabajo

I.3.1 *Astrovirus*

Los astrovirus pertenecen a la familia *Astroviridae* que está dividida en 2 géneros: *Mamastrovirus* (especies del 1 al 19) y *Avastrovirus* (especies del 1 al 3), que infectan a mamíferos y aves, respectivamente. Son virus con simetría icosaédrica, sin envoltura, de 28 a 30 nm de diámetro, con un genoma compuesto por una cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva y una superficie del virión que forma una estructura característica en forma de estrella. Su genoma tiene una longitud de 6.8- 7.9 kb y contiene tres marcos abiertos de lectura del inglés Open Reading Frame (ORFs): ORF1a, ORF1b y ORF2. ORF1a y ORF1b codifican para las proteínas no estructurales implicadas en la replicación y transcripción del ARN, mientras que el ORF2 codifica al precursor de la proteína de la cápside que es el que presenta la mayor diversidad genética entre las proteínas virales y es generalmente utilizado para la genotipificación viral (Arowolo et al., 2020) (Figura 1).

Según el informe de 2018 del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV-<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>), los astrovirus humanos (HAstV) se clasifican en HAstV clásicos, clado Melbourne (MLB), y clado Virginia (VA). Los HAstV clásicos comprenden los genotipos 1-8 (HAstV-1-8). Los clados MLB y VA son genéticamente distintos de los HAstV clásicos y están estrechamente relacionados con los astrovirus animales (Arowolo et al., 2020).

El clado MLB consta de tres linajes: MLB1, MLB2 y MLB3, y todos están asignados a las especies de *Mamastrovirus* 6. El clado VA se subdivide en los linajes VA1 a VA5. De estos, VA2 y VA4 pertenecen a *Mamastrovirus* 8, VA1 y VA3 pertenecen a la especie *Mamastrovirus* 9, mientras que VA5 puede clasificarse como una nueva especie. Los nuevos HAstV son filogenéticamente

distantes de los clásicos (Hast et al, 2016; Vu et al., 2017; Tao et al., 2019). MLB- y VA-AstV son virus emergentes que se descubrieron en 2008 y 2009, respectivamente, y solo se dispone de información limitada sobre ellos (Hata et al 2018).

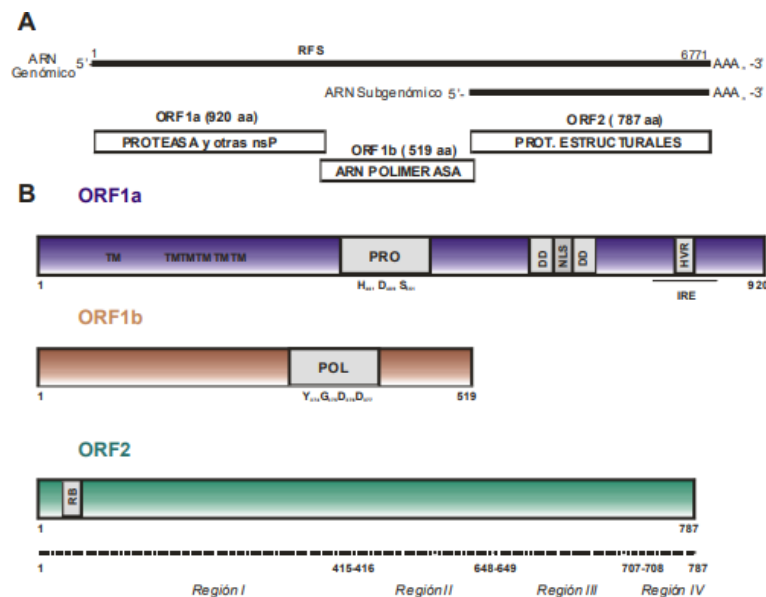


Figura 1. (A) Organización genómica del HAsV-1 (Acc. No. L23513); RFS: del inglés ribosomal frameshifting. (B) Representación esquemática de los tres ORF destacando los motivos más característicos de cada uno de ellos; TM: dominio transmembrana; PRO: motivo de proteasa; DD: dominio de muerte; NLS: secuencia de localización nuclear; HVR: región hipervariable; IRE: epítipo inmunoreactivo; POL: motivo de ARN polimerasa; y RB: zona rica en residuos básicos. (extraído de la tesis doctoral de Santiago Caballero, https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42389/1/Tesis_Santiago_Caballero.pdf)

Los HAsV son transmitidos mediante la ruta fecal oral causando gastroenteritis principalmente en niños menores de 2 años, aunque las personas inmunocomprometidas y los ancianos también constituyen grupos de alto riesgo para los casos de gastroenteritis aguda (De Benedictis et al., 2011).

El virus induce una diarrea acuosa leve que dura entre 2 a 3 días y puede estar asociada a vómitos, fiebre, anorexia y dolor abdominal. El periodo de incubación es de 4-5 días, el cual se sitúa por encima de rotavirus (1 a 3 días) y *calicivirus* (1 a 2 días) (Lee et al., 2013; Bosch et al., 2014). A pesar de tratarse de cuadros sintomáticos leves, cabe tenerlos en cuenta dentro del marco de la salud pública ya que han sido causantes en numerosas ocasiones de brotes de gastroenteritis en escuelas, guarderías, geriátricos y hospitales (Domínguez et al., 2009). De igual modo, se ha de tener una consideración especial en aquellos pacientes que estando inmunosuprimidos adquieren una infección

por HAsTV, ya que se han documentado casos en los que la sintomatología incrementa su severidad con respecto a pacientes inmunocompetentes (Coppo et al., 2000; y Cunliffe et al., 2002). La naturaleza casi ubicua de estos virus tiene su paralelo en su alta diversidad genética y el espectro de enfermedades que van desde la infección asintomática hasta la diarrea grave e incluso la propagación extragastrointestinal, incluida la encefalitis mortal. (Vu et al 2017) La notificación de casos de meningitis y encefalitis mortales, especialmente en personas inmunocomprometidas, ha ampliado el espectro de su enfermedad (Vu et al 2017).

En la mayoría de las especies, las infecciones por astrovirus afectan al aparato gastrointestinal, pero en aves también se han descrito otras enfermedades como la nefritis intersticial aguda y el retraso del crecimiento en pollos (Imada et al., 1979), hepatitis en patos (Gough et al., 1984) y la enfermedad llamada *poult enteritis* y síndrome de la mortalidad en pavos (Koci et al.; 2000).

Al igual que sucede con otros virus entéricos como rotavirus y calicivirus, las infecciones por astrovirus son más frecuentes en los meses fríos y/o lluviosos del año, y se ha propuesto un patrón de incidencia bianual (Mustafa et al., 2000; Guix et al., 2002) También se han descrito casos en los que no se evidencia una marcada estacionalidad, sobre todo en países con clima más uniforme a lo largo de todo el año como en México y Egipto (Guerrero et al., 1998; Naficy et al., 2000). Son extremadamente frecuentes y en varios países se ha observado que alrededor del 90% de la población de 9 años de edad o más tiene anticuerpos contra HAsTV tipo 1 (HAsTV-1) (Johnson et al., 2017)

Los astrovirus fueron identificados por primera vez como agentes infecciosos causantes de gastroenteritis en el año 1975 durante la investigación de un brote de diarrea y vómitos entre los niños de una sala de maternidad en Londres, Inglaterra (Appleton & Higgins, 1975) y desde ese momento han sido considerados uno de los agentes más importantes de la gastroenteritis aguda (GA) viral en niños. Recientemente se han descubierto astrovirus muy divergentes que infectan a los humanos y se han asociado con infecciones extraintestinales. Aunque la transmisión zoonótica no se ha reconocido

claramente, la similitud genética entre algunos astrovirus que afectan a humanos y astrovirus animales hacen que este evento sea probable (Vu et al., 2017).

I.3.2 **Norovirus**

Los NoV pertenecen a la familia *Caliciviridae* y actualmente se clasifican en 10 genogrupos (GI-GX) y 49 genotipos (9 GI, 27 GII, 3 GIII, 2 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII, 1 GVIII, 1 GI y GX) teniendo en cuenta a la secuencia del gen que codifica a la cápside. Aunque también, se ha propuesto complementar esta clasificación utilizando la región de la ARN polimerasa (RdRp) dividiendo a estos virus en 60 tipos P (Chhabra et al., 2019). Son virus de tamaño pequeños y presentan una simetría icosaédrica de 28 a 35 nm de diámetro. Su genoma está compuesto por una cadena de ARN de sentido positivo de aproximadamente 7,7 kb de longitud y organizado en tres ORFs. El ORF1 codifica una poliproteína que se escinde postraduccionalmente en siete proteínas no estructurales (NS1 – NS7), que participan en la replicación viral; el ORF2 codifica la proteína principal de la cápside (VP1) que mantiene la estructura del virus junto con la proteína menor de la cápside (VP2) codificada en el ORF3 (Vinje et al., 2015) (Figura 2).

Son responsables de brotes y casos esporádicos de gastroenteritis agudas y la principal causa de epidemias de gastroenteritis causadas por microorganismos no bacterianos (Greening & Cannon, 2016; Amarasiri et al., 2019). Fueron los primeros virus que se visualizaron en heces, mediante microscopía electrónica en un brote de gastroenteritis ocurrido en un colegio de Norwalk, Ohio; en ese momento se les denominó virus Norwalk (Bellido Blasco, 2006; Ribes Fernández & Buesa Gomez, 2010).

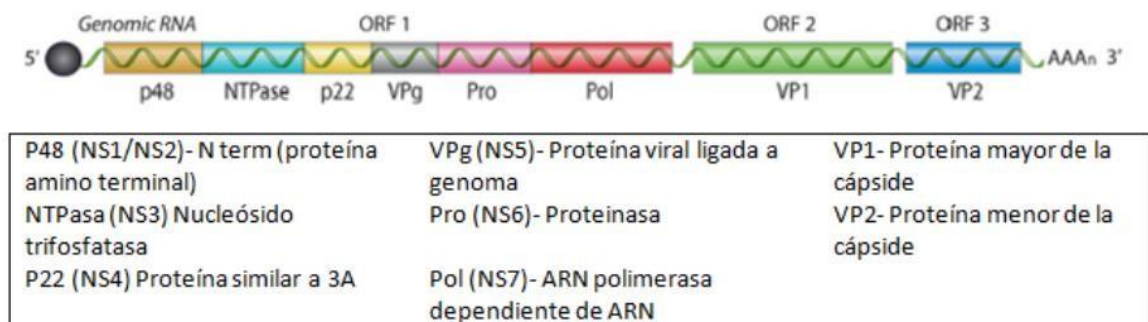


Figura 2. El genoma del Norovirus presenta tres marcos de lectura abiertos (ORF), designados ORF 1, ORF 2 y ORF 3 que codifican ocho proteínas virales. ORF 1 codifica las seis proteínas no estructurales (NS) que son procesadas proteolíticamente por la cisteína proteinasa codificada viralmente (Pro). ORF 2 y ORF 3 codifican los componentes estructurales del virión, las proteínas virales VP1 y VP2, respectivamente (tomada de Robilotti et al., 2015).

A mediados de la década de 1990, los NoV se dividieron principalmente en genogrupos y genotipos basados en secuencias parciales de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Cuando más secuencias estuvieron disponibles, la clasificación cambió para designar genogrupos y genotipos basados en la secuencia completa de aminoácidos de VP1 (Chhabra et al., 2019). En 2013 investigadores del grupo de trabajo de clasificación de Norovirus (NCWG) propusieron una nomenclatura estandarizada universal y un sistema de tipificación para la genotipificación de los NoV GI y GII utilizando el agrupamiento filogenético de las secuencias de aminoácidos VP1 completas y se clasificaron en seis genogrupos (GI a GVI). Estos genogrupos se dividieron en más de 40 genotipos (Chhabra et al., 2019; Fumian et al., 2019), con características antigénicas propias y virulencia variable (Bellido Blasco, 2006). Los NoV del genogrupo GI y GII son los más frecuentes que infectan a los humanos y se dividen en 9 y 27 genotipos, respectivamente (Alam et al., 2016). Sin embargo, solo un genotipo (GII.4) ha sido la causa más frecuente de infecciones en todo el mundo (Fumian et al., 2019). Durante los últimos años, ocho variantes GII.4 han estado circulando, cada una reemplazando una variante dominante anterior y desde 2012, GII.4 Sidney es la variante dominante a nivel mundial (Chhabra et al., 2019). En 2014, por primera vez, en Asia se identificó la cepa GII.17 Kawasaki que rápidamente se convirtió en un genotipo predominante en todo el mundo. Esta cepa es más virulenta y tiene la capacidad de escapar a la inmunidad adquirida de infecciones previas con GII.4. Presenta una mayor estabilidad

ambiental lo que contribuyó a su transmisión generalizada en muchos países después del 2014 aumentando los brotes de gastroenteritis en varias regiones, incluidas Asia y Europa (Chan et al. 2017; Lun et al. 2018; Hasing et al. 2019; Chen et al. 2020).

Los síntomas comunes asociados con la infección por NoV son diarreas, vómitos, náuseas y calambres estomacales, junto con fiebre leve, dolor de cabeza, escalofríos, dolores musculares y fatiga (Lopman et al., 2015), que se desarrollan dentro de las 12 a 48 h posteriores a la exposición, y la mayoría de las personas inmunocompetentes mejoran después de 1 a 3 días de haber comenzado con los síntomas. Los síntomas en la mayoría de los pacientes se resuelven por sí solos (Teunis et al., 2008).

La incidencia de los brotes provocados por NoV no parece variar mucho entre países de bajos ingresos y de ingresos medios y altos, lo que los convierte en la principal causa de enfermedades diarreicas a nivel global, con alrededor de 18 casos por cada 100 personas (Randazzo et al., 2018). Causan 685 millones de casos de diarrea cada año. Aproximadamente 200 millones de casos son en niños menores de 5 años y se estima que causan la muerte de unos 50.000 niños cada año, principalmente en los países en desarrollo. Sin embargo, la enfermedad por norovirus es un problema tanto en los países de bajos ingresos como en los de ingresos altos. Se estima que anualmente los norovirus originan costos de 60.000 millones de dólares en el mundo, en concepto de atención médica y pérdida de productividad (CDC, 2024).

NoV ocupa el segundo lugar después de los rotavirus del grupo A como agentes etiológicos causantes de gastroenteritis grave en edades jóvenes (Prado et al., 2014, Lin et al., 2021). Sin embargo, en un trabajo realizado con muestras clínicas en China en el período de 2009 a 2018, en pacientes con cuadros de diarrea aguda en adultos (≥ 18 años), el norovirus fue el principal patógeno, seguido por el rotavirus A y el astrovirus (Wang et al., 2021).

En un trabajo realizado en Vietnam, el 78% de brotes estuvo relacionado al mismo genotipo (53/68) y en Japón se reportaron 39 brotes entre diciembre de 2001 y abril de 2006 (Ritchie, 2018). Nuevas variantes de GII.4 emergen cada 2-3 años y se convierten en la principal causa de epidemias globales de gastroenteritis agudas (Kim et al., 2013). En el invierno de 2014-2015, una nueva variante del NoV GII.17 surgió y se hizo predominante en Huzhou, China y reemplazó a la cepa GII.4 Sídney 2012 que circulaba anteriormente. Sin embargo, ese predominio fue temporal y nuevamente el GII.4 es el prevalente a nivel mundial (Cheng et al., 2020).

En 2016, la Organización Mundial de la Salud declaró que debería ser una prioridad absoluta desarrollar una vacuna contra el NoV, pero a pesar de esto, lamentablemente actualmente no existe ninguna vacuna aprobada contra el NoV (Zhang et al., 2021). Actualmente, están en diferentes fases de ensayos clínicos el desarrollo de tres tipos de vacunas contra el NoV: partículas similares a virus (VLP) no replicativas, partículas P y adenovirus recombinantes (Zweigart et al, 2021). Las investigaciones sobre la vacunación contra el norovirus indican que puede reducir la incidencia de la gastroenteritis relacionada con el norovirus, aunque en la literatura existe escasa información al respecto. Un artículo destacado concluyó que la vacunación pediátrica en guarderías podría reducir significativamente las infecciones y, si bien las vacunas están asociadas a diferentes costos económicos, ofrecen ganancias en años de vida ajustados por calidad (DALYS) (Esposito, 2020).

I.3.3 Rotavirus

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y se clasifica en ocho serogrupos antigénicos (A a H) y dos especies provisionales (I y J) que infectan humanos y animales, clasificados según una glicoproteína de la cápside interna. Sólo los grupos A, B y C infectan al ser humano, y el resto afectan a otros animales, siendo el rotavirus del grupo A (RVA) la especie más común que causa GA en

humanos. (Bellido Blasco, 2007). La partícula viral 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 (McClain et al., 2010).

Los rotavirus fueron descubiertos por primera vez por Bishop y colaboradores (1973) a través del análisis por Microscopia Electrónica (ME) de células epiteliales del duodeno de niños con gastroenteritis aguda (GA), donde 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 colaboradores (1974) en la materia fecal de niños con la misma sintomatología. 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 y fueron constituidos como un nuevo género denominado Rotavirus, dentro de la familia *Reoviridae* (Flewett & Wood, 1978).

Las proteínas de la capa exterior VP7 y VP4 son la base de un sistema de clasificación binaria para G tipos (glicoproteína) y P tipos (proteína sensible a proteasa), respectivamente. Los genotipos G y P del RVA se definen según diferencias en la secuencia de nucleótidos de los genes VP7 y VP4. Al menos 42 genotipos G y 58 genotipos P han sido definidos (RCWG 2018). Poseen un genoma de ARN doble hebra (ARNdh) segmentando, formado por 11 segmentos, denominados segmentos genómicos. Los 11 segmentos genómicos varían en longitud entre 667 pb (segmento 11) a 3.302 pb (segmento 1), y cada uno de ellos codifica para una proteína viral, con excepción del segmento 11 que puede codificar para 2 proteínas (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). (Figura 3)

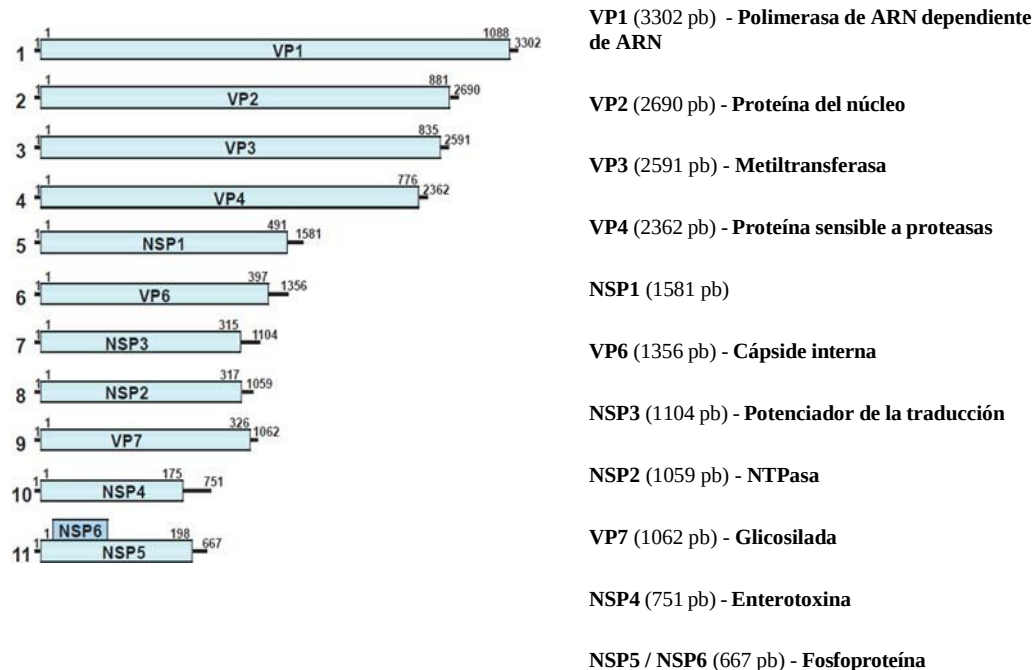


Figura 3- Estructura del genoma del virus rotavirus. Se muestran los segmentos de ARN (en nucleótidos) en sentido positivo. Las líneas en los extremos 5' y 3' representan las regiones no codificantes. Se enumeran en negrita funciones clave de las proteínas (Estes & Greenberg, 2013).

Rotavirus es la causa más común de GA en niños a nivel mundial y se estima que la infección por rotavirus representa el 39% de los pacientes con diarrea menores de 5 años de edad ingresados en el hospital y aproximadamente 200.000 muertes cada año ocurren por dicha causa (Kotloff et al., 2017).

Afecta principalmente a lactantes y niños pequeños, con mayor gravedad entre los 6 y 24 meses de edad, mientras que los neonatos suelen presentar infecciones leves o asintomáticas. Su transmisión es global, con mayor incidencia en invierno en países templados y persistencia endémica en regiones

tropicales y aunque los adultos pueden ser reservorios del virus, los principales propagadores son los niños con diarrea (Simhon, 1985)

El período de incubación es de 1 a 3 días y el virus, en general, se excreta durante 5 a 7 días. La infección puede ser leve o grave, pudiendo llegar a provocar la muerte por deshidratación. La mayoría de los niños sufren vómitos, seguidos de diarrea y fiebre asociada, causando cuadros de deshidratación severos (Carlson et al. 1978; Middleton 1978; Estes et al., 1983).

A partir del 2006, más de 100 países han introducido la vacuna contra el rotavirus en sus programas de vacunación de manera obligatoria (Burnett et al., 2020). De forma general, entre los niños <5 años se ha observado una reducción media del 59% en las hospitalizaciones por rotavirus, del 36% en las hospitalizaciones y mortalidad por GA luego de introducida la vacuna a los esquemas de vacunación (Burnett et al., 2020). Un estudio en Perú observó que, tras la vacunación generalizada, la prevalencia de infecciones por rotavirus entre los casos hospitalizados por GA disminuyó significativamente, lo que refleja la eficacia de la vacuna en reducir la gravedad de los casos en menores de 5 años (Juliao et al., 2021). En este contexto, también se ha observado un aumento en la proporción de otros virus como norovirus y calicivirus, que se convierten en agentes importantes de GA después de reducir la carga de rotavirus (Bennett et al., 2020). En Seúl, Corea del Sur, se observó una marcada disminución de hospitalizaciones de niños por rotavirus luego de implementada la vacunación respecto a la era pre vacuna (Shim et al., 2016).

En lo que se refiere a la epidemiología molecular de rotavirus, en un trabajo realizado en 5 regiones de Brasil con muestras clínicas se observó que el genotipo G3P[8] fue el más prevalente durante dos años de estudio (84% en 2018 y 66% en 2019), y la posterior secuenciación de algunas muestras demostró que pertenecían al genotipo emergente de tipo equino G3P[8] (Gutierrez et al., 2020). En otro trabajo realizado en Argentina donde se compararon eras pre y pos vacuna se evidenció la presencia del genotipo G2P[4] como el más prevalente en el período post vacunación, sugiriendo un cambio en la dinámica de los genotipos circulantes (Santos et al., 2017).

I.4 Vigilancia molecular de virus gastroentéricos en ambiente

Desde el descubrimiento del ADN como molécula portadora de la información genética heredable, ha sentado las bases para el desarrollo de las técnicas de biología molecular que han revolucionado los procedimientos de detección y caracterización de diferentes patógenos. El desarrollo de dichas técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) junto con la tecnología de secuenciación del ADN, han proporcionado una gran metodología sensible y específica para determinar la circulación de diversos virus y estudiar su epidemiología (Artika et al., 2020).

La secuenciación por Sanger ha revolucionado varios campos de la investigación, desde la medicina y la genética hasta la agricultura y la conservación de la biodiversidad. Con los conocimientos obtenidos del análisis genómico, los científicos pueden desarrollar terapias dirigidas, mejorar el rendimiento de los cultivos, rastrear brotes y prevenir enfermedades (Peraza et al., 2017).

En la última década hemos observado una explosión en la tecnología concerniente a la secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*) donde encontramos diferentes metodologías que nos permiten obtener un profundo conocimiento de la diversidad viral presente en una determinada muestra (Hjelmso et al. 2017). El término secuenciación de nueva generación (NGS) hace referencia a las tecnologías diseñadas para analizar gran cantidad de ADN de forma masiva y paralela (Rubio et al., 2020).

Varios estudios han realizado la vigilancia ambiental de estos virus en aguas residuales como una forma efectiva de obtener información de la epidemiología molecular de los virus circulantes en la población a través de la red de saneamiento también puede ser un método útil para la detección incipiente de brotes provocados por estos y proveer una alerta temprana antes de que éstos sean registrados en los pacientes de las instituciones de salud (Barril et al., 2010; Hellmer et al., 2014; Tort et al., 2015a; Olesen et al., 2021).

Las aguas residuales contaminadas sirven como un reservorio importante de virus, que puede variar según la región (características geográficas y climáticas), el nivel de desarrollo y/o el estado de salud de la población y las prácticas de gestión de las aguas residuales. La vigilancia molecular mediante la secuenciación por Sanger y NGS de virus patógenos en aguas residuales se utiliza para estudiar la circulación de los diferentes genotipos en una población y poder predecir brotes de enfermedades (Bleotu et al., 2024). La identificación y genotipificación por medio de la secuenciación por Sanger de las diferentes cepas de virus gastroentéricos es de gran importancia. En aguas residuales en los Estados Unidos, así como también en las aguas subterráneas y ríos en Nepal, se identificaron astrovirus humanos clásicos de tipos 6 y 7, astrovirus VA emergentes de tipo 5 y recombinantes putativos. La prevalencia de astrovirus clásicos y VA se observó durante los meses más fríos, mientras que fue durante los meses más cálidos que se detectaron los astrovirus MLB (Hata et al., 2018). En un trabajo realizado por Wu y colaboradores (2020) con muestras clínicas en Shanghai, China, se observó que HAsV mostró una estacionalidad típica de invierno/primavera y fue más alta su prevalencia en el grupo de edad de 5 a 14 años. Las muestras fueron secuenciadas por Sanger revelándose que HAsV-1 fue el genotipo más prevalente, seguido de HAsV-5, HAsV-4, HAsV-2, HAsV-8 y HAsV-3. Fue observado un aumento dramático en la prevalencia de HAsV-4 desde diciembre de 2015 hasta marzo de 2016, y las cargas virales de HAsV-4 fueron significativamente más altas que las de otros genotipos.

Fumian y colaboradores (2019) utilizaron la NGS para determinar los genotipos de Norovirus GII encontrados en el afluente, el efluente primario y el efluente secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales en Río de Janeiro, Brasil. Los resultados demostraron la prevalencia de 6 genotipos principales de NoV GII en las muestras de aguas residuales. Estos datos se compararon con los datos clínicos correspondientes como parte de una vigilancia de la circulación de cepas pandémicas y epidémicas de norovirus en el área examinada y se encontró que dos cepas de norovirus, GII.5 y GII.7, eran prevalentes en las muestras de aguas residuales, pero no se detectaron en las muestras clínicas, indicando que estas cepas pueden provocar infecciones asintomáticas o leves, que no se reportan en los sistemas de vigilancia epidemiológica de salud pública.

Martínez-Puchol y colaboradores (2020) utilizaron NGS para determinar la distribución de virus en tres plantas de tratamiento de aguas residuales en la ciudad de Barcelona, España. Los análisis de secuenciación mostraron que las tres plantas de tratamiento de aguas residuales tenían una distribución similar de tipos de Adenovirus (HAdV), Papilomavirus y Enterovirus humanos. En un trabajo realizado en Estados Unidos donde se analizaron muestras de lodos crudos y digeridos de plantas de tratamiento de aguas residuales, la NGS mostró que, además de los virus generalmente asociados con infecciones gastrointestinales, las muestras de lodos examinadas tenían una abundancia de virus asociados con enfermedades respiratorias incluyendo a los HAdV tipos B y C, Bocavirus y Coronavirus HKU1, que pueden transmitirse por vía aérea (propagación por gotículas) o por fómites. Miura y colaboradores (2021) investigaron a los RVA mediante secuenciación MiSeq de Illumina en muestras de agua ambientales recolectadas de una planta de tratamiento de agua potable entre abril de 2019 y marzo de 2020 donde se identificaron los genotipos humanos G8, G3 y G2, con predominio de G8 en muestras tomadas durante la temporada epidémica de rotavirus entre abril y junio. También se detectaron los genotipos porcinos G5, G11 y G4 y bovinos G10 y G6. El análisis de la secuencia de VP4 reveló que el genotipo humano P[8] estuvo presente durante todo el año, mientras que P[4] y P[9] estuvieron presentes solo en la temporada epidémica. También se detectaron las cepas de la vacuna P[5] y P[8] (RotaTeq®).

En un trabajo realizado en Argentina en agua de río en una zona de playa se detectó astrovirus y se caracterizó molecularmente evidenciando la circulación de HAstV-3, 5 y 7 (Masachessi et al., 2018). En otro trabajo realizado en una planta de tratamiento de aguas residuales en Rio de Janeiro, Brasil, se detectó la circulación de HAstV-1 (Fumian et al., 2013). En un estudio realizado en aguas residuales en Japón se identificaron secuencias pertenecientes a los clados MLB2, VA1 y VA2 (Hata et al., 2015). En China, VA2, MLB1 y VA1 fueron los subtipos más comunes en aguas residuales seguidas de VA5, MLB2 y VA3 (Tao et al 2019). En otro trabajo realizado en muestras clínicas en toda China donde se estudiaron pacientes con diarrea aguda, astrovirus fue detectado como uno de los agentes causantes de dichos casos, en adultos mayores de 18 años junto a norovirus y rotavirus A y no en niños y adolescentes (Wang et al., 2021). En un

trabajo realizado por Kumthip y colaboradores (2023) en Tailandia en aguas ambientales, astrovirus fue el que presentó un mayor porcentaje de detección frente a otros cinco virus gastroentéricos entre los que se encontraron adenovirus y rotavirus, siendo todas las cepas detectadas de astrovirus pertenecientes a MLB1 (Kumthip et al., 2023).

En playas de agua dulce de la zona de Belém, Brasil, se observó una positividad de NoV de 38% (39/104) de las muestras de agua superficial, y el genogrupo GI (69%) fue observado con mayor frecuencia que el GII (26%), con una cocirculación de ambos genogrupos en dos muestras (5%) (de Deus et al., 2019). En Argentina, en un trabajo realizado a partir de muestras de brotes de gastroenteritis, en el 62% de las muestras analizadas se detectó norovirus y en el 7% rotavirus (Degiuseppe et al., 2020). En un trabajo realizado en aguas residuales de diferentes ciudades del Uruguay, se evidenció una alta circulación de diferentes genotipos de norovirus GI y GII e interesantemente, se observó el reemplazo de la variante New Orleans 2009 por la variante Sydney 2012 (Victoria et al., 2016).

En un trabajo realizado en África, los genotipos más frecuentemente encontrados de RVA entre el 2006 y 2016, fueron el G1 (33%), seguido del G2 (17%), G3 (10%), G9 (9%) y G12 (8%) entre los tipos G. Los tipos P más comunes fueron P[8] (49%) seguido de P[6] (23%) y P[4] (12%) y la combinación G1P[8] (23%) fue la más encontrada seguida por G2P[4] (8%), G9P[8] (7%) y G2P[6] (5%). El norte de África presentó la mayor prevalencia del genotipo P[8] (66%). Esta revisión proporciona una visión integral de las cepas de rotavirus que circulan en África, que pueden ser importantes a la luz de las nuevas vacunas contra rotavirus (Ouermi et al., 2017). En Tailandia en un estudio realizado por Kittigul y colaboradores (2021), el genotipo más frecuentemente detectado fue G1, seguido por G3, G9, G2 y G6 para los G-tipos, mientras que para los P-tipos fue P[6].

En Uruguay, se han realizado estudios de estos tres virus entéricos tanto en muestras clínicas como en muestras de aguas residuales en las cuales se ha observado una alta circulación de diferentes estirpes virales en elevadas concentraciones, evidenciando no solo la contaminación de los cuerpos de agua

utilizados para diferentes fines por parte de estas aguas residuales contaminadas sino también la presencia de una amplia diversidad genética de estos virus entéricos en la población local donde fueron realizados estos estudios (Berois et al. 2003, Lizasoain et al. 2015, Victoria et al. 2014, 2016, Tort et al 2015a, 2015b).

Un estudio realizado en nuestro país por Lizasoain y colaboradores en 2015, en aguas residuales de cuatro ciudades ribereñas del Río Uruguay, demostró la circulación en dichas poblaciones de MLB-1 y los clásicos HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-5.

1.5 Análisis Cuantitativo de Riesgo Microbiológico (QMRA)

El desarrollo de metodologías moleculares, como la PCR en tiempo real (qPCR), permite detectar y cuantificar partículas virales en muestras clínicas y en diferentes entornos ambientales. Esto ha facilitado la creación de herramientas para evaluar los riesgos a la salud asociados a la exposición a virus entéricos en cuerpos de agua utilizados para actividades específicas, como las aguas superficiales destinadas a la recreación o las aguas destinadas al consumo humano. Estas metodologías moleculares han contribuido en estos análisis ya que muchos de estos virus no presentan cultivo celular estandarizado o son considerados “virus fastidiosos” por su dificultad de crecer y generar efecto citopático en una línea celular permisiva. La metodología más utilizada para determinar este riesgo es el modelaje probabilístico de la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (*Quantitative microbial risk assessment* - QMRA). Por medio de este enfoque se puede determinar el riesgo de infección de diferentes patógenos, entre ellos virus entéricos, en diversas matrices acuáticas con la finalidad de preservar la salud de los individuos que utilizan dichas aguas para un determinado fin (Chigor et al. 2014, Prez et al. 2015, Vergara et al. 2016). El QMRA se ha utilizado para comprender mejor la magnitud y el origen de los riesgos de enfermedad, las contribuciones de las diferentes vías de transmisión y las oportunidades para implementar intervenciones con el fin de prevenir o mitigar infecciones (Brouwer et al., 2018).

Es una herramienta utilizada para el modelado y caracterización de la exposición a patógenos presentes en el medio ambiente o alimentos utilizando un modelo dosis-respuesta. Los modelos utilizados en el análisis de riesgo se componen de una serie de pasos que son ejecutados reiteradas veces para generar una distribución de resultados pudiendo así obtener un análisis probabilístico. En la década de 1980, el QMRA inicialmente fue aplicado para estimar el riesgo de contraer enfermedades causadas por patógenos transmitidos por el agua, utilizando funciones que se ajustaban a datos publicados en la literatura, y a partir de ese momento se han utilizado en diversos entornos de riesgo. Los avances tecnológicos y metodológicos han continuado con la finalidad de mejorar esta herramienta, y ha sido adoptado como marco de evaluación en muchos ámbitos (Carmona et al., 2011; Galdos-Balzategui et al., 2017; Brouwer et al., 2018). Los modelos de dosis-respuesta se utilizan para examinar los modos de transmisión y las estrategias óptimas de intervención por parte de las autoridades. La elección del modelo a utilizar a menudo depende de las vías de transmisión específicas, de los patrones de enfermedad observada en un contexto determinado y del patógeno en evaluación (Brouwer et al., 2018).

La caracterización del riesgo en el modelo QMRA puede realizarse de dos maneras:

1. **Determinista:** Se utilizan valores únicos, como las medias de las concentraciones, para describir las variables del modelo. En este enfoque, se seleccionan y combinan estimaciones fijas de cada variable en la evaluación de la exposición y sus efectos, con el fin de calcular el riesgo para la salud (Haas et al., 1999).
2. **Probabilística:** Se emplean distribuciones estadísticas para representar las variables del modelo, lo que permite reflejar de manera más precisa la incertidumbre y variabilidad inherentes a la mayoría de ellas. Este enfoque ofrece una visión más realista del riesgo al considerar la naturaleza estocástica de los factores involucrados (Haas et al., 1999).

El análisis por QMRA está compuesto por los siguientes pasos: identificación de peligros, evaluación de la exposición, modelado de dosis-respuesta y caracterización de los riesgos (Haas et al., 1999).

La identificación de peligros en la evaluación de riesgos define su alcance y propósito, seleccionando los patógenos relevantes mediante un equipo interdisciplinario. Este equipo aborda preguntas clave sobre los peligros, sus impactos en la salud, vías de exposición y eventos peligrosos. El enfoque escalonado del QMRA permite priorizar riesgos, determinar la urgencia de los problemas, y asignar recursos de manera efectiva, comenzando con una evaluación inicial y avanzando hacia estudios más detallados si es necesario (Haas et al., 1999).

La evaluación de la exposición determina con qué frecuencia y en qué cantidad las personas entran en contacto con patógenos a través de rutas peligrosas previamente identificadas. Para ello, se necesitan datos precisos sobre la concentración de patógenos en el agua, su eliminación en los procesos de tratamiento y características de la población expuesta, como su composición demográfica y la frecuencia con la que se enfrenta a estos riesgos (Haas et al., 1999).

El modelado dosis-respuesta analiza el impacto en la salud de los peligros identificados para una población específica, considerando efectos como secuelas, gravedad, duración de enfermedades y la relación entre la dosis ingerida y la probabilidad de infección, enfermedad o secuelas. También se determinan las probabilidades de morbilidad y mortalidad asociadas a cada patógeno de referencia (Haas et al., 1999). Las ecuaciones dosis-respuesta para cada patógeno de referencia consisten en funciones matemáticas que combinan la dosis (cantidad de patógeno ingerido) derivado de la evaluación de la exposición para calcular la probabilidad individual esperada de infección (P_{inf}) por exposición por evento de baño (Federigi et al., 2020). La dosis ingerida de cada patógeno se calcula por ejemplo, como el producto entre las concentraciones de los patógenos en las aguas de baño y la distribución del volumen de agua ingerida por los bañistas (Dufour et al., 2017).

La caracterización de los riesgos integra datos de exposición y efectos en la salud para evaluar la probabilidad y gravedad de impactos adversos en la población expuesta. Esto genera una medida cuantitativa del riesgo, que puede expresarse en distintas escalas de tiempo, desde exposiciones únicas hasta múltiples eventos anuales (Haas et al., 1999). El riesgo puede cuantificarse en diferentes criterios de valoración, incluida la probabilidad de infección y la probabilidad de enfermedad. En este análisis es importante incluir la variabilidad, como las concentraciones de los patógenos en un río y la incertidumbre, que se refiere a la falta de comprensión y/o incapacidad para medir ciertos parámetros (Haas et al., 1999). El riesgo para la salud es calculado combinando las distribuciones estadísticas y utilizando métodos de Monte Carlo (Haas et al., 1999).

A nivel global en países con sistemas avanzados de gestión de agua potable, el QMRA se ha incorporado a los sistemas de agua municipales como parte de un cambio de enfoque en la industria del agua potable, adoptando una planificación basada en la seguridad del agua y la evaluación de riesgos. Su objetivo principal es reducir el riesgo de infecciones en la población (Hamouda et al., 2018).

En algunos países como Australia, Estados Unidos y Nueva Zelanda, el QMRA se aplica de forma rutinaria en las regulaciones acerca de las aguas destinadas a fines recreativos, especialmente baños (NHMRC, 2008; MfE, 2017; USEPA, 2017).

En un trabajo previo realizado por nuestro equipo, se evaluó el riesgo de infección por RVA en aguas con fines recreativos de las cuencas del río Uruguay y Santa Lucía de forma determinística. Se pudo observar que los riesgos de infección por RVA al utilizar dichas aguas con fines recreativos variaron entre un 3% y un 68%, correspondiendo la probabilidad más alta de infección al Río Uruguay y la más baja al Río Santa Lucía (Bortagaray et al., 2020).

Sección II- Relevancia

La recreación en ambientes acuáticos representa una actividad habitual y de gran valor social en diversas comunidades, particularmente durante la temporada estival. Sin embargo, múltiples estudios epidemiológicos han evidenciado que la exposición a aguas recreativas contaminadas, ya sea por descargas de aguas residuales domésticas o escorrentías pluviales, está estrechamente asociada con un incremento en el riesgo de infecciones entéricas causadas por virus de transmisión hídrica, tales como rotavirus (RVA), norovirus (NoV) y astrovirus (HAstV) (Wade et al., 2018). En este contexto, la identificación precisa de los genotipos virales que circulan en diferentes regiones geográficas constituye un insumo crítico para la vigilancia epidemiológica y la toma de decisiones en salud pública. Dicha caracterización permite discriminar entre cepas vacunales y no vacunales, reconocer variantes con mayor virulencia, y diseñar estrategias preventivas adecuadas para minimizar el impacto sanitario de estos agentes infecciosos. Esta información es especialmente relevante para la protección de grupos vulnerables, como los niños, y para la planificación de acciones en centros de atención primaria y entornos educativos de la primera infancia.

En Uruguay, los estudios sobre el riesgo microbiológico asociado a virus entéricos en cuerpos de agua dulce han sido escasos. En este sentido, nuestro grupo de trabajo desarrolló el primer estudio nacional de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico (QMRA) en aguas de los ríos Santa Lucía y Uruguay, empleando un enfoque determinístico (Bortagaray et al., 2020). La experiencia adquirida en dicha investigación permitió reconocer la necesidad de incorporar metodologías probabilísticas más representativas de la complejidad ambiental y epidemiológica. A partir de esta base, el presente estudio se propone también evaluar el riesgo microbiológico de infección por virus gastroentéricos en el balneario Las Cañas, con énfasis en las actividades recreativas y de pesca. Este abordaje incluye la caracterización molecular de virus en aguas residuales de ciudades ribereñas del Río Uruguay, lo cual permitirá generar evidencia científica de alto valor para la gestión de riesgos sanitarios y ambientales.

La relevancia de esta investigación radica en su potencial para fortalecer la vigilancia ambiental de virus entéricos, optimizar la gestión de aguas residuales,

mejorar las prácticas de saneamiento y, en última instancia, garantizar ambientes recreativos más seguros. Además, los resultados obtenidos podrán contribuir al desarrollo de políticas públicas orientadas a la prevención de enfermedades hídricas, promoviendo así el bienestar y la calidad de vida de las comunidades expuestas.

Sección III- Hipótesis

En las aguas residuales de las ciudades ribereñas del Río Uruguay como lo son Bella Unión, Salto y Fray Bentos, circula una elevada diversidad de estirpes de virus gastroentéricos, cuya presencia implica un riesgo potencial de infección para los usuarios del río en actividades recreativas y de pesca.

Sección IV- Objetivos

IV.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente los principales virus gastroentéricos que circulan en poblaciones ribereñas del Río Uruguay y evaluar el riesgo microbiológico de infección de dichos virus en este río.

IV.2 Objetivos específicos:

- Realizar la caracterización molecular de Rotavirus, Norovirus y Astrovirus humanos en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay en las ciudades de Bella Unión, Salto y Fray Bentos por diferentes metodologías (Sanger y NGS) con un enfoque de epidemiología basada en aguas residuales.
- Evaluar cuantitativamente el riesgo microbiológico de infección por estos virus gastroentéricos en bañistas del balneario Las Cañas y pescadores de la ciudad de Fray Bentos en el Río Uruguay.

Sección V- Resultados

Los resultados de esta tesis se presentan principalmente en formato de artículo científico, ya que durante su desarrollo y cumplimiento de los objetivos específicos se lograron dos publicaciones en revistas científicas internacionales con revisión por pares e indexadas en bases de datos reconocidas. Además, se incluyen algunos resultados inéditos, los cuales servirán como base para un tercer artículo en proceso de elaboración. Esta sección se organiza en tres capítulos que muestran los hallazgos de la tesis en relación con los objetivos específicos: la caracterización molecular mediante secuenciación por la tecnología de Sanger y NGS y la evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico (QMRA). Los resultados de la secuenciación por la tecnología de Sanger y el análisis de QMRA se presentan en formato de artículo científico, al haber sido publicados en revistas arbitradas, mientras que los hallazgos de la secuenciación por la tecnología de NGS se estructuran en un formato de artículo científico en preparación.

Capítulo I: “Caracterización molecular de virus gastroentéricos en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay ”

Los principales agentes virales causales de gastroenteritis aguda (GA) en niños y adultos a nivel mundial son el rotavirus del grupo A (RVA), astrovirus humano (HAstV) y norovirus (NoV). El objetivo correspondiente a este capítulo fue realizar la caracterización molecular de RVA, NoV y HAstV humanos en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay — específicamente en las ciudades de Bella Unión, Salto y Fray Bentos— mediante secuenciación por Sanger, con un enfoque de epidemiología basada en aguas residuales (*Wastewater-Based Epidemiology*, WBE).

Metodología

Se analizaron 36 muestras de aguas residuales colectadas en Bella Unión, Salto y Fray Bentos, durante el período 2017–2018. Las muestras fueron concentradas, luego se hizo la extracción del ácido nucleico y posteriormente la transcripción reversa. Se realizaron pcr cuantitativa y cualitativa para RVA, NoV GI, NoV GII y HAstV. Cabe destacar que se colectaron muestras en la ciudad de Paysandú, las cuales resultaron negativas para todos los virus analizados mediante PCR en tiempo real. Posteriormente, se confirmó con información de OSE que en ese punto ya no circulaban aguas residuales, motivo por el cual se decidió excluir ese sitio del estudio publicado.

Como control del proceso de laboratorio, todas las muestras fueron inoculadas con el fago PP7 antes de iniciar la concentración viral, con el fin de evaluar la eficiencia de recuperación y detectar posibles inhibiciones en la amplificación. Posteriormente, se realizó una PCR multiplex en tiempo real para RVA y PP7, observándose inicialmente inhibición de la reacción. Para resolverlo, se generó un nuevo cDNA utilizando una dilución 1:10 del ácido nucleico extraído, lo que permitió eliminar la inhibición y lograr un 100% de detección del control PP7, asegurando así la confiabilidad de los resultados.

Resultados y discusión

El virus más frecuentemente detectado fue RVA (50%), seguido de HAstV (39%), NoV GII (36%) y NoV GI (25%). Las cepas de RVA se caracterizaron genéticamente como P[8] y G3, según los genes VP4 y VP7, respectivamente. Entre las muestras positivas para norovirus se identificaron los genotipos GI.2, GI.3, GI.5, GI.6 y GI.7, mientras que para NoV GII se detectaron los genotipos GII.6, GII.2 y GII.4. En el caso del astrovirus humano, se identificó un único genotipo perteneciente al HAstV MLB1.

El enfoque basado en epidemiología en aguas residuales permitió obtener un panorama representativo de la diversidad genética y la co-circulación de estos virus entéricos en las tres ciudades de la cuenca del Río Uruguay durante 2017–2018.

Estos hallazgos refuerzan la relevancia de la vigilancia ambiental como herramienta complementaria a la vigilancia clínica para el seguimiento epidemiológico de los agentes

etiológicos de gastroenteritis aguda, ya que la WBE incluye tanto a individuos sintomáticos como asintomáticos, ofreciendo una cobertura poblacional más amplia.



Molecular Characterization of Gastroenteric Viruses in Wastewater from Cities in Uruguay

Bortagaray Viviana¹ · Salvo Matias² · Mir Daiana³ · Colina Rodney¹ · Victoria Matias¹

Received: 23 June 2023 / Accepted: 29 September 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

Group A Rotavirus, Human Astrovirus, and Norovirus (RVA, HAsV, and NoV) are recognized as the major causative agents of acute gastroenteritis in children and adults worldwide. The aim of this study was to determine the prevalence and molecular epidemiology of RVA, HAsV, and NoV in wastewater from three cities in Uruguay. Thirty-six samples from Bella Unión, Salto, and Fray Bentos cities were analyzed using quantitative and qualitative PCR. RVA was the most frequently detected virus (50%), followed by HAsV (39%), NoV GII (36%), and NoV GI (25%). RVA strains were characterized as P[8] and G3 based on the VP4 and VP7 genes, respectively. Among NoV-positive samples, genotypes GI.2, GI.3, GI.5, GI.6, GI.7, GII.2, GII.6, and GII.4 were detected, and only one HAsV genotype (MLB1) was found. Our wastewater-based epidemiological approach provides a snapshot of the overall genetic diversity of these viruses in three cities of the Uruguay River basin during 2017–2018. These findings reinforce the importance of this environmental surveillance tool for monitoring epidemiological trends of enteric viruses circulating in the population, which can be used to guide public health intervention.

Keywords Wastewater · Enteric viruses · Molecular characterization

Introduction

Enteric viruses are a group of viruses that infect and replicate in the gastrointestinal tract of the host, causing different diseases such as gastroenteritis, encephalitis, or viral hepatitis. Their mode of transmission is through the fecal–oral route, being therefore, commonly found in wastewater. (Banyai et al., 2018). These viruses in wastewater frequently contaminate rivers and lakes constituting a source of infection when people enter in contact with these recreational environments. Their transmission is very efficient since they are frequently excreted in high concentrations (reaching up to 10¹¹ viral particles per gram of fecal matter) in the feces

of infected people, persist for long periods of time in the environment, and present a low infective dose (Banyai et al., 2018). Viral acute gastroenteritis (VAGE) is a major cause of morbidity and mortality in infants less than 5-years-old mainly in developing countries (Ghssein et al., 2018; Gupta et al., 2017). Diarrheal disease is the second most important cause of death in children under five years old, with 1.7 billion cases and 525,000 deaths annually in children in this age group, worldwide (WHO, 2017).

Within the enteric viruses, Group A Rotavirus (RVA), Human Astrovirus (HAsV), and Norovirus (NoV) are recognized as the main cause of gastroenteritis in humans worldwide (Estes & Greenberg, 2013; Robilotti et al., 2015; Vu et al., 2017). RVA belongs to the family *Reoviridae* and possesses a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA. The current classification of RVA genotypes is based on the sequence of the VP7 gene (which encodes the G-capsid protein) and VP4 gene (which encodes the P-capsid protein), and at least 36 G genotypes and 51 P genotypes have been identified (RCWG, 2018). Human Astroviruses belong to the *Astroviridae* family and are classified into classical HAsV, Melbourne (MLB) clade, and Virginia clade (VA) according to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2018). Classical HAsVs consist in

✉ Victoria Matias
matviemon@gmail.com

¹ Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay

² Department of Water, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay

³ Genomic and Bioinformatic Unit, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay

1–8 genotypes (HAstV-1–8), while the MLB and VA clades are genetically distinct from classical HAstVs and present a near genetic relationship with animal astroviruses (Arowolo et al., 2020). Finally, NoV belongs to the *Caliciviridae* family and is subdivided into 10 genogroups (G), GI to GX, with GI and GII (which include human strains) further divided into 9 and 27 genotypes, respectively (Chhabra et al., 2019).

RVA during 2015–2016 in wastewater treatment plants (WWTP) in Catalonia, Spain was detected in the 90% of the samples demonstrating high prevalence of circulation in this population with the presence of genotypes G2, G3, G9, G12, P[4], P[8], P[9], and P[10] (Silva-Sales et al., 2020). Considering RVA molecular epidemiology in Iran, genotypes G10 and G1 were the predominating genotypes detected in treated and raw sewage of two WWTPs (Atabakhsh et al., 2020). Another study conducted by Kargar et al. (2013) in Shiraz Hospital, reported the predominance of genotype G1.

Recent studies in HAstVs suggested that they also affect the central nervous system. Type 1 VA-AstVs are strongly suggested to be associated with encephalitis in immunocompromised patients (Lum et al., 2016). Compared to other human enteric viruses such as noroviruses and rotaviruses, HAstVs are not deeply characterized (Hata et al., 2018). Types 1 and 2 MLB-AstVs were identified in wastewater samples collected in the United States, whereas all known genotypes of MLB-AstVs (types 1–3) were found from samples collected in Nepal (Hata et al., 2018). In children with acute gastroenteritis in Japan (2012–2013) MLB1 and MLB2 strains were the most predominant clade, followed by classical astrovirus and VA astrovirus (Khamrin et al., 2016).

Previous studies determined a high prevalence of NoV in several regions worldwide, such as Africa where GII.4 genotype dominates (Afework et al., 2022). Similarly, in Brazil, GII was responsible for 71% of NoV-positive VAGE cases, with GII.4 prevailing across all the regions of the country (Fioretti et al., 2011; Bitencurt et al., 2019). Notably, there have been at least six epidemic strains of GII.4 since 1995, namely US 1995/96, Farmington Hills 2002, Hunter 2004, Den Haag 2006b/Yerseke_2006a, New Orleans 2009, and Sydney 2012 (Bitencurt et al., 2019).

Studies of enteric viruses in Uruguay, conducted nearly a decade ago (2011–2012), analyzed both clinical and wastewater samples. These investigations revealed the presence of several viral strains reflecting a wide circulation in the local population. These findings provide evidence that wastewater is a significant source of contamination and poses a potential public health risk in this region (Lizasoain et al., 2015; Victoria et al., 2014, 2016; Tort et al., 2015a, 2015b).

Wastewater-based epidemiology (WBE) is a tool that provides a snapshot of the overall health of a community based on what is excreted in sewage (Mao et al., 2021). The WBE approach has multiple applications, including its use as an

early alert of a viral circulation (Aguar-Oliveira et al., 2020) and as an effective method to determine the viral molecular epidemiology (Barril et al., 2010; Hellmer et al. 2014, Prevost et al. 2015, Tort et al., 2015a, Guo et al., 2022, Yu et al., 2022).

The present study aim to shed light on the RVA, NoV and HAstV strains that circulated in three cities from the northwestern region of Uruguay by analyzing wastewater samples obtained from March 2017 to February 2018 through a WBE approach.

Materials and Methods

Wastewater Sampling

From March 2017 to February 2018, monthly collections of wastewater were performed in three cities from the northwestern region of Uruguay: Bella Unión, Salto, and Fray Bentos. Bella Unión is located at the northern region of Uruguay with a population of 18,406 inhabitants (INE, 2011). Salto is located 143 km south from Bella Unión with a population of 104,028 inhabitants (INE, 2011). Fray Bentos is located 241 km south from Salto with a population of 24,406 inhabitants (INE, 2011). All the cities are located on the riverside of the Uruguay River, the most important river of the country (Fig. 1). Samples from Salto and Fray Bentos city were collected in the single pipe of each city, which directly discharges untreated sewage from these cities into the Uruguay river. In Bella Unión city, the sewage samples were collected into a stream where the treated wastewater is directly discharged from a two stabilization ponds system.



Fig. 1 Map of Uruguay showing the sampling points located in each city: Bella Unión, Salto, and Fray Bentos

This wastewater collection sites were determined in order to represent the population of each city.

Viral Concentration, Nucleic Acid Extraction, and Reverse Transcription

Wastewater samples were concentrated by the ultracentrifugation method described by Pina et al. (1998). Briefly, 42 mL of sample were centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C. The pellet was eluted in 3.5 mL of 0.25 N glycine buffer (pH 9.5) and incubated on ice for 30 min with shaking every 5 min. Then, 3.5 mL of PBS 2X (pH 7.2) was added, mixed, and centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min. The supernatant was quickly transferred to an ultracentrifugation tube and the pellet was removed. Another centrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C was performed and the supernatant was quickly discarded. The pellet was resuspended in 200 μ L of 1 $\times$ PBS and stored at –80 °C for further analysis. The viral recovery rate of ultracentrifugation viral concentration method is about 12% for both PP7 and recombinant AdV from wastewater (Blanco Fernandez et al., 2017).

Viral RNA was extracted from 140 μ L of the concentrated sample using the commercial QIAamp Viral RNA kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). The manufacturer's protocol was followed, and the purified viral RNA was eluted in 30 μ L of elution buffer and stored at –80 °C until the reverse transcription (RT) procedure. Extracted RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScript II Reverse Transcriptase and Random Hexamer Primers (both from Invitrogen™, USA), according to the manufacturer's instructions. Ten microlitres of RNA and tenfold dilution of the RNA were used as a template for RT in order to remove enzymatic inhibitors presented in wastewater samples.

Quantitative PCR (qPCR)

For detection and quantification of RVA, NoV GI, GII, and HAdV, three qPCR were performed with TaqMan technology and Rotor-Gene Q instrument (Qiagen®). Undiluted and tenfold diluted samples were analyzed in duplicate using SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline, London, UK) together with primers and probes for RVA (Zeng et al., 2008), HAdV (Dai et al., 2010), and a multiplex for NoV GI and GII (Pang et al., 2005; Schultz et al., 2011).

RVA standard curve was performed with nine points of serial dilutions of plasmid from 10^8 to 10^0 genomic copies/reaction (gc/r) that yield a slope of –3.59 and a reaction efficiency of 0.90. The standards curve of NoV GII and NoV GI were performed with the same serial dilutions as the RVA quantification that yields a slope of –3.43 and a PCR efficiency of 0.96 for NoV GII and –3.02 and 1.14 for NoV GI. For HAdV, the standard curve was performed with the same dilutions as RVA, NoV GI, and NoV GII with a slope of

–3.31 and efficiency of the reaction of 1.01. The detection limits of the qPCR reactions for RVA, NoV GI, NoV GII, and HAdV were 5, 30, 5, and 5 genomic copies per qPCR reaction, respectively. Samples presenting no signal amplification (not detected) were considered below the detection limit of this technique.

Molecular Characterization

Nested PCR for RVA

Two nested PCR were used for G and P genotypes of the VP7 and VP4 genes, respectively (WHO, 2009). The primers used in the first round PCR for G and P, were 9con1/9con2 and 4con2/4con3, respectively. The second round PCR contains the internal primers VP7F/VP7Rdeg (881 bp) for G and VP4F/VP4R (663 bp) for P genotypes.

PCR for HAdV

Detection of emerging HAdVs was performed with primers SF0073 and SF0076 that target a highly conserved region of the ORF 1b (viral RNA polymerase) of astroviruses. The amplicon obtained is 409 bp long (Finkbeiner et al., 2009).

Semi-nested PCR for NoV

Two semi-nested PCRs (GI and GII) were used. For GI, primers COG1F/G1SKR and G1SKF/G1SKR were used for the first (380 bp) and second (330 bp) rounds, respectively. For GII, primers COG2F/G2SKR and G2SKF/G2SKR were used for the first (390 bp) and second (340 bp) round PCRs, respectively. These primers hybridize in the ORF1/ORF2 junction region and the 5' region of ORF2 (VP1 capsid protein) (Kitajima et al., 2010).

All the PCR products were run in a 1.5% agarose gel electrophoresis and the amplicons were purified with the commercial AxyPrep™ DNA Gel Extraction kit (AXYGENT®). DNA strands were sequenced by Sanger sequencing methodology at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) and sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers: OQ324916, OQ346254, OQ346261, OQ346262, OQ414203, OQ414237, OQ414241, OQ414242, OQ421105, OQ421123 for NoV GI; OQ356350, OQ356465, OQ357263, OQ357880, OQ357897, OQ357900, OQ358122, OQ358123, OQ421257, OQ421437, OQ503416 for NoV GII. OQ513257 and OQ603360 for HAdV. OQ603361, OQ603362, OQ626714, and OQ626713 for RVA.

All the procedures were performed using nuclease-free water as negative control and viral strains of known genotypes for each virus as positive controls.

Phylogenetic Analysis

The molecular characterization of RVA, HAsV, and NoV strains was performed by Maximum Likelihood (ML) phylogenetic analysis of the sequences obtained from the amplicons of these viruses.

Assembly and editing of the sequences were performed with Seqman® version 7.0 (DNASTar Lasergene, Madison, WI, USA). All datasets were aligned using MAFFT v7.467 program and subjected to ML phylogenetic analysis.

The ML phylogenetic trees were inferred with IQ-TREE 1.6.1 software under the best-fit model of nucleotide substitution selected using the ModelFinder application (RVA VP4: TIM + F + G4, RVA VP7: HKY + F + I, NoV GI: TIM2e + I + G4, NoV GII: TIM3e + I + G4, and HAsV: TIM2 + F + I + G4). Branch support was assessed using the approximate likelihood-ratio test based on a Shimodaira–Hasegawa-like procedure (SH-aLRT) with 1,000 replicates. Final trees were visualized in FigTree v1.4.4.

Results

Between March 2017 and February 2018, monthly wastewater sampling was performed from three cities in the north-western region of Uruguay, Bella Unión, Salto, and Fray Bentos. RVA was detected in 50% of the analyzed samples (18/36) through qPCR. Additionally, HAsV was detected in 39% of the wastewater samples, while NoV GII and GI were present in 36% and 25% of the analyzed samples, respectively (Fig. 2).

In untreated wastewater from both Fray Bentos and Salto cities, the studied viruses were detected year-round except in July 2017 in Fray Bentos and October 2017 and January 2018 in Salto. On the other hand, in treated wastewater from Bella Unión, these viruses were scarce detected over the analyzed period and NoV GII was not detected (Fig. 2).

Regarding untreated wastewater samples, RVA and NoV GII were the viruses with the highest frequency of detection in Fray Bentos, both detected in 67% of the samples. Additionally 5 out of 12 samples (42%) from Fray Bentos were positive for HAsV and 4 out of 12 (33%) were positive for NoV GI. In Salto, the virus with the highest frequency of detection was RVA, detected in 58% of the samples, followed by HAsV in 42%. NoV GII and NoV GI were detected in 33% and 25% of the samples analyzed from Salto, respectively.

In Bella Unión, RVA and HAsV were detected in 25% of the samples and NoV GI in 8.3% of them. It is important to highlight that in Bella Unión, treated wastewater samples were analyzed.

The co-circulation of different viruses in the same samples was observed as follows: in November 2017 in Fray

Bentos RV and NoV GI; in November 2017 in Salto NoV GI and GII; in September 2017 in Salto NoV GII and HAsV (Fig. 2).

RVA was observed with a geometric mean concentration of $1.3\text{E}+03$ gc/L, NoV GI and GII presented a geometric mean concentration of $2.8\text{E}+05$ and $1.7\text{E}+04$ gc/L, respectively, and for HAsV the geometric mean concentration was $1.3\text{E}+04$ gc/L (Fig. 2).

In order to perform the molecular characterization of RVA, we analyzed VP4 and VP7 genes. For VP4, we obtained 2 amplicons that corresponded to samples collected in Salto in December 2017 (OQ603361) and January 2018 (OQ603362). Both samples were classified as genotype P[8] by the Rotavirus Genotyping web-based tool (Maes et al., 2009) and according to the phylogenetic analysis they were closely related (SH-aLRT = 95) to Argentinian and Brazilian strains detected in 2006, 2008, and 2009 (Fig. 3). The amplicons obtained for VP7 corresponded to samples collected in Fray Bentos in September 2017 (OQ626714) and November 2017 (OQ626713). These samples were classified by the Rotavirus Genotyping web-based tool as G3 genotype and according to the phylogenetic analysis they are closely related to strains detected in Brazil and Peru in 2010, 2011 and 2014 (SH-aLRT = 100) (Fig. 4).

The phylogenetic analysis of the emerging HAsV strains revealed that strains collected in 2017 in August in Salto (OQ513257) and September in Fray Bentos (OQ603360) were classified as Mamastrovirus 6 of the MLB1 group. These strains were closely related to previously published Uruguayan strains collected in Treinta y Tres and Melo in 2012 and 2013 (SH-aLRT = 78) (Fig. 5).

The phylogenetic analysis of the NoV GI strains characterized in this study showed that the isolates detected belonged to genotypes GI.2 ($n=1$), GI.3 ($n=2$), GI.5 ($n=2$), GI.6 ($n=1$), and GI.7 ($n=4$). Our GI.2 strain from Bella Unión sampled in 2017 (OQ414203) was closely related (SH-aLRT = 99.9) to previously detected GI.2 strains sampled in Brazil in the period 2015–2016. The GI.3 sample collected from Salto in March 2017 (OQ324916) clustered together with Brazilian strains from 2012 and 2015 and an Uruguayan strain from Treinta y Tres collected in 2011 (SH-aLRT = 87). The GI.3 sample collected in Salto in May 2017 (OQ421105) represents a second independent introduction of this genotype to this city and was closely related (SH-aLRT = 83) to samples from Brazil collected in 2013, 2014, and 2016. The GI.5 strains detected in January and February 2018 in Fray Bentos, grouped together (SH-aLRT = 99), probably representing a unique introduction of this genotype to this Uruguayan city. Additionally, the phylogenetic analysis suggests that these GI.5 strains were more closely related (SH-aLRT = 92) to a GI.5 Brazilian strain from 2015 than to an Uruguayan GI.5 strain from Paysandu detected in 2012. Similarly, the GI.6 strain collected in Fray Bentos

Fig. 2 Frequency and concentration of RVA, NoV GI, NoV GII, and HAsV in wastewater samples monthly collected for one year in Bella Union, Salto, and Fray Bentos cities, Uruguay

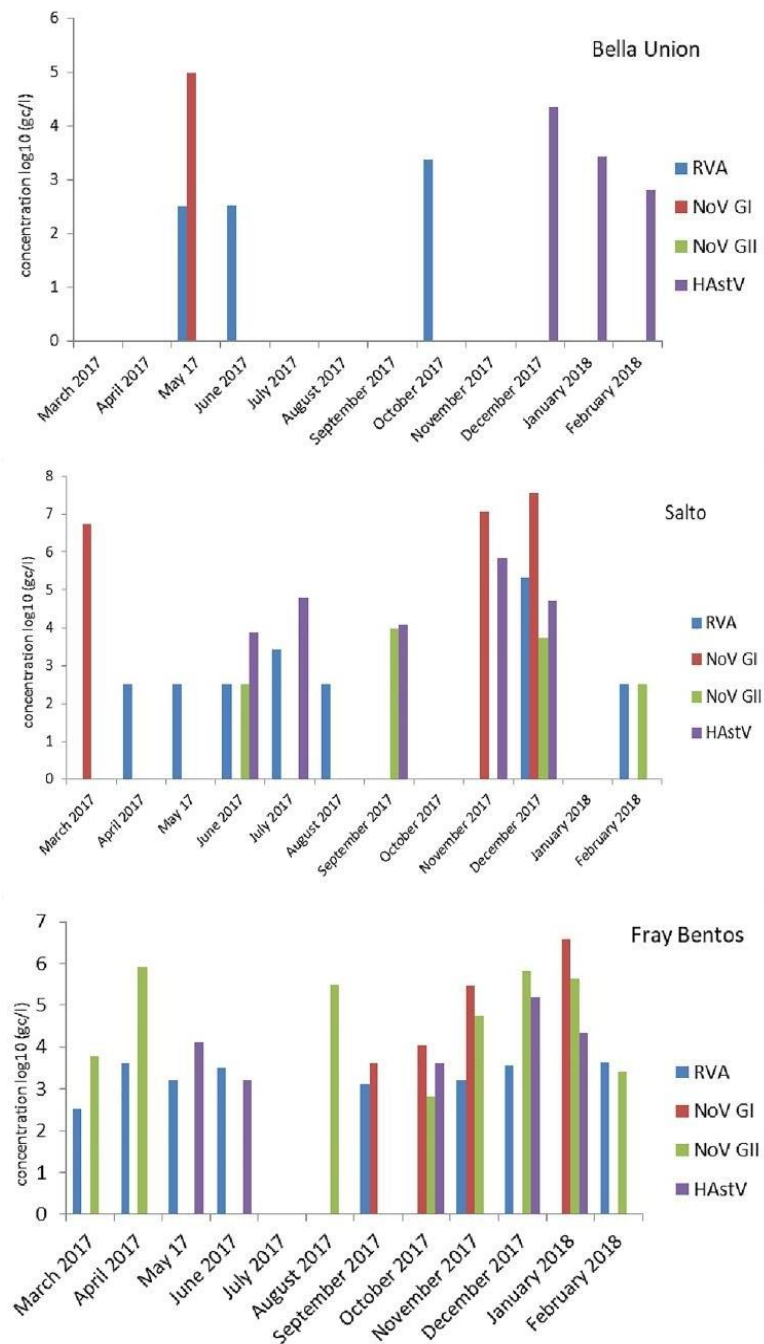




Fig. 3 Phylogenetic analysis of a partial region of the RVA VP4 gene (630 bp) for P[8] genotype. The statistical support for each branch is indicated by the SH-aLRT value. Samples sequenced in this study are

highlighted in red, while those from previous studies conducted in Uruguay are shown in blue (Color figure online)

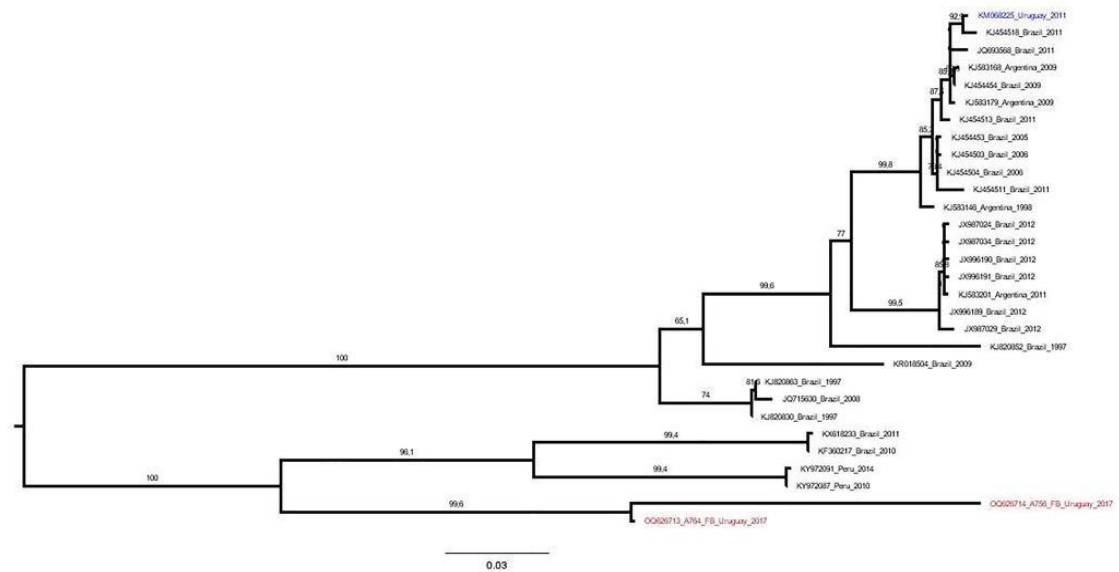


Fig. 4 Phylogenetic analysis of a partial region of the RVA VP7 gene (809 bp) for G3 genotype. The statistical support for each branch is indicated by the SH-aLRT value. Samples sequenced in this study are

highlighted in red, while those from previous studies conducted in Uruguay are shown in blue (Color figure online)

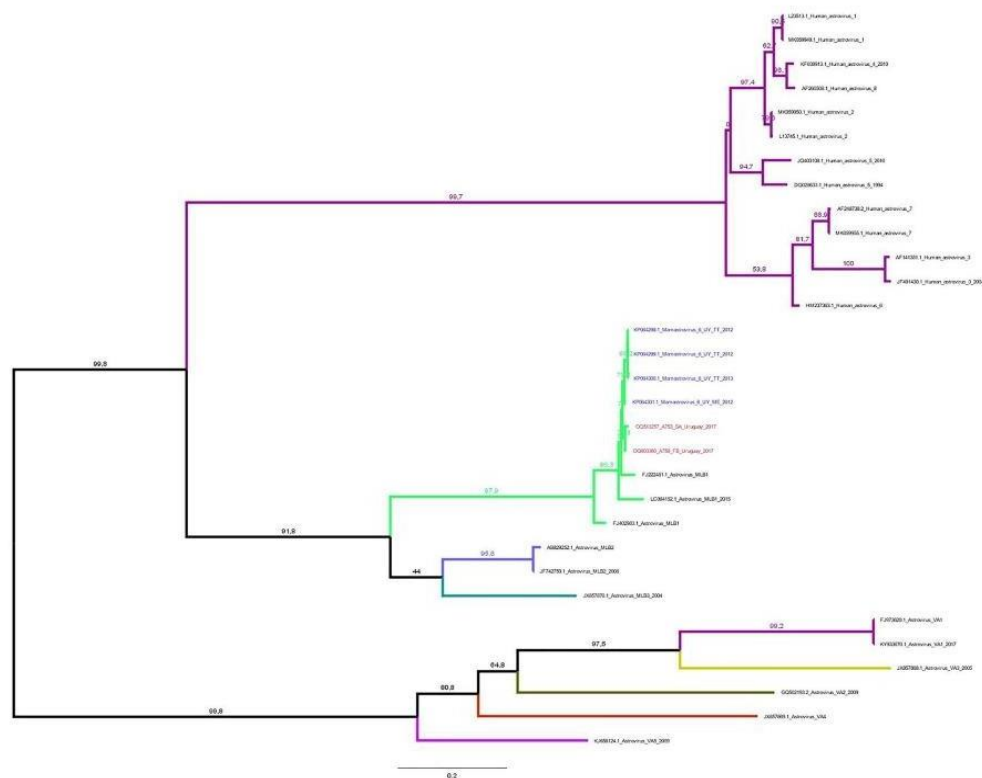


Fig. 5 Phylogenetic analysis of emerging HAsVs based on a partial region of the RNA polymerase region (394 bp). The statistical support for each branch is indicated by the SH-aLRT value. Samples

sequenced in this study are highlighted in red, while those from previous studies conducted in Uruguay are shown in blue (Color figure online)

in 2017 (OQ414241) was more closely related to a Brazilian GI.6 strain collected in 2014 (SH-aLRT = 84) than to an Uruguayan GI.6 strain from Treinta y Tres detected in 2013. The four GI.7 strains from Salto and Fray Bentos collected between October and December 2017 segregated in a highly supported (SH-aLRT = 99.5) monophyletic group, raising the possibility of a single event of introduction probably from Brazil with a subsequent regional dispersion (Fig. 6).

The phylogenetic analysis of the NoV GII strains characterized in this study showed that the isolates detected belonged to genotypes GII.4 ($n = 3$), GII.2 ($n = 5$), GII.6 ($n = 3$). The samples A732 from March 2017 Fray Bentos (OQ357263), A759 September 2017 (OQ357900), and A761 October 2017 (OQ357880) both from Bella Unión, samples A758 collected from September 2017 (OQ357897) and A741 from May 2017 (OQ421437) from Salto were classified as GII.2. Samples A732 and A741 were closely related to a strain observed in Chile 2016. Samples A761, A758, and A759 were similar to Brazilian strains from 2003. The Uruguayan strains observed in

2011–2012, classified as GII.2 were not closely related to the sequences obtained in this study. Samples A745 from June 2017 (OQ358122) and A766 (OQ358123) from November 2017, both from Salto, and sample A754 (OQ421257) collected in August 2017 in Fray Bentos, grouped together in GII.6 and were closely related to a strain detected in Chile 2016. Concerning GII.4 strains, samples A777 (OQ356350) from February 2018 (Salto) and A778 (OQ503416) from the same date (Fray Bentos) were similar and closely related with a strain described in Chile 2018. The sample A771 (OQ356465) collected in December 2017 in Bella Unión was closely related to a strain isolated in Chile 2018. The Uruguayan GII.4 strains isolated in 2017–2018 were classified as New Orleans 2009 and Sydney 2012 variants by the Norovirus genotyping tool. Similar to the results of the GII.2 Uruguayan strains, the Uruguayan GII.4 strains isolated in 2011–2012 were divergent when compared with the Uruguayan strains detected in 2017–2018. The SH-aLRT support values were > 80% for all the genotypes of NoV GII (Fig. 7).

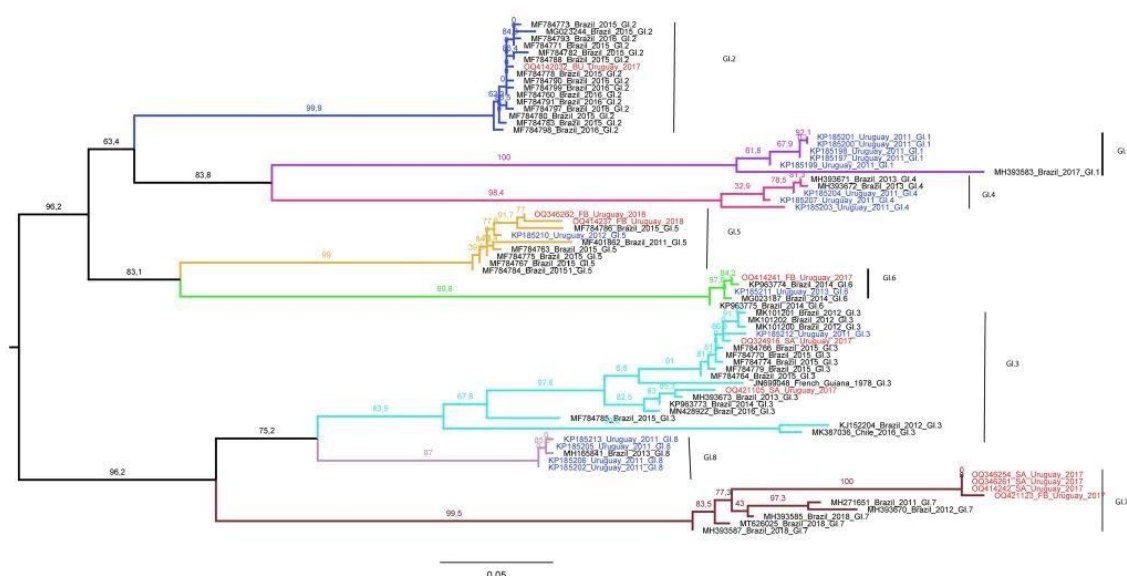


Fig. 6 Phylogenetic analysis of a partial region of the VP1 gene (291 bp) of NoV GI. The statistical support for each branch is indicated by the SH-aLRT value. Samples sequenced in this study are

highlighted in red, while those from previous studies conducted in Uruguay are shown in blue (Color figure online)

Discussion

In this study, a molecular characterization of three gastroenteric viruses, RVA, NoV, and HAdV was performed using a WBE approach. In comparison to surveillance based on clinical diagnostic testing, monitoring enteric viruses in a WBE approach present a major advantage of comprehensive population-based surveillance of circulating virus by capturing persons who did not have diagnostic testing performed during gastroenteritis as well as including patients with asymptomatic infection (Lin et al., 2021). The objective of this work was to obtain a snapshot of the circulating strains in the population of three Uruguayan cities throughout a year (2017–2018). Analyzing wastewater samples provides an estimate of the epidemiology of viruses infecting the populations served by the sanitation network and enables the observation of gastroenteritis outbreaks caused by the studied viruses. Unfortunately, no epidemiological information from clinical samples was available in our country in order to compare the presence of these viruses in wastewater with gastroenteritis outbreaks in the population. Therefore, it is not possible to know the significant impact of the strains detected in wastewater on human health.

Considering the frequency and distribution of all the untreated wastewater analyzed samples, the prevalence of RVA was higher when compared with NoV GI, NoV GII, and HAdV. Moreover, RVA was detected throughout the year, indicating its continuous circulation in these areas

which discharge their wastewater into the Uruguay River. These findings are consistent with the previous studies from southern Brazil based on clinical samples, where RVA was also detected year-round (Gutierrez et al., 2020). The ability of rotaviruses to remain infectious in harsh environments and wastewater treatment process may contribute to their prevalence as one of the most common enteric viruses (Tavakoli Nick et al., 2020). However, despite these findings, previous studies from Brazil, Uruguay, and Iran reported a marked RVA seasonality during colder months in both environmental and clinical samples (Atabakhsh et al., 2020; Bortagaray et al., 2019; Gutierrez et al., 2020). Further studies with longer periods and higher frequency of sample collection are necessary in order to confirm the absence of seasonality as observed in this work.

Considering the distribution of NoV GI and GII throughout the study period of this work in all the untreated wastewater analyzed samples, no clear seasonality pattern was observed. However, previous studies suggested that NoV has greater incidence and persistence in cold environments and its spread may be affected by environmental factors such as relative humidity and latitude, as well as demographic characteristics. In our study, although NoV GI and GII were detected in both cold and warm seasons, the virus was more frequently distributed during the warm season. This contrast with numerous clinical studies where NoV VAGE cases and outbreaks tend to occur during winter or cooler months (Eftim et al., 2017; Shamkhali Chenar & Deng, 2017; Farkas

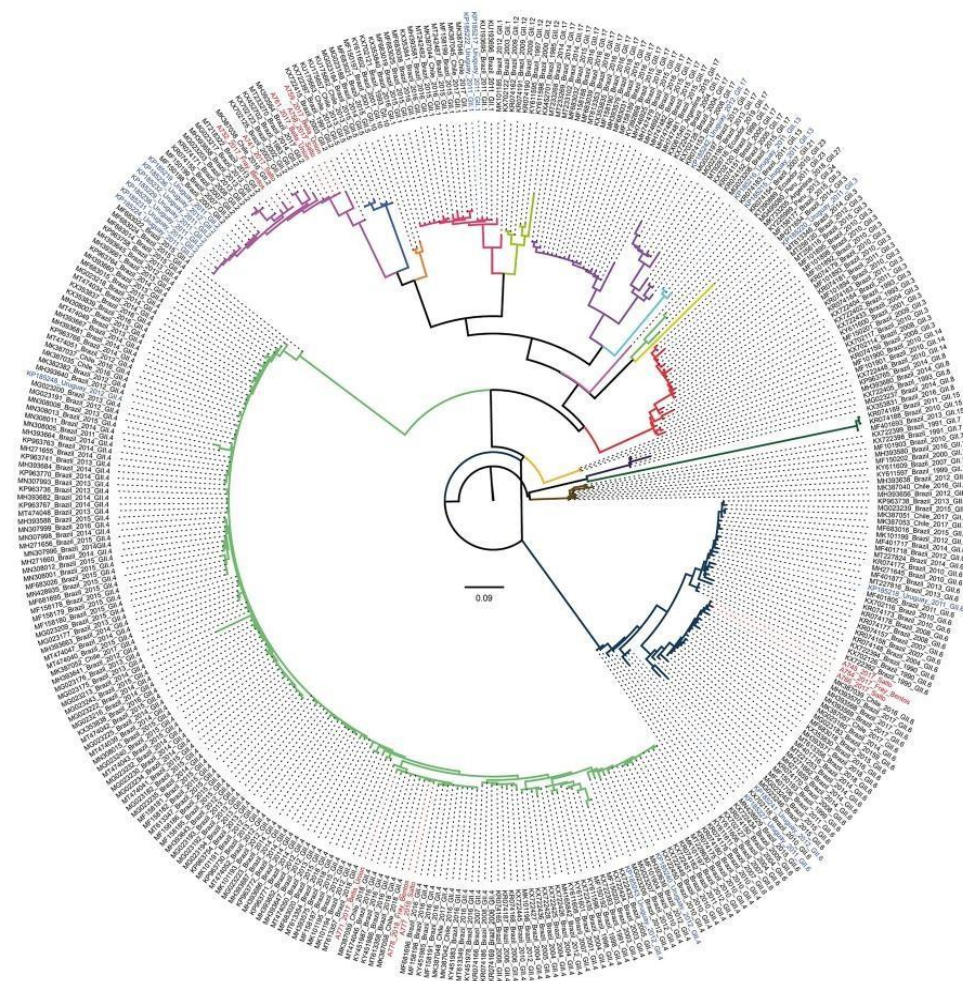


Fig. 7 Phylogenetic analysis of a partial region (302 bp) of NoV GII VP1 gene. The SH-aLRT support values were > 80% for all the genotypes. Samples sequenced in this study are highlighted in red, while

those from previous studies conducted in Uruguay are shown in blue (Color figure online)

et al., 2018; van Beek et al. 2018; Huang et al., 2022). Additionally, marked seasonality of NoV has been observed in China where the majority of NoV disease peaks occur from October to March during the cold season (Wei et al., 2021). In our study, NoV and HAstV were also detected in all the seasons throughout the year, without any significant seasonality. In the literature there is no information about Astrovirus seasonality in the environment.

It is important to highlight that the sample collection site in Bella Union was a stream where the treated wastewater was discharged, then, the reduced frequency of viral detection compared to the other sites was expected. Virus removal

in wastewater by stabilization ponds treatment is highly variable among several studies (reviewed in Verbyla & Mihelcic, 2015). This removal combined with the possibility of a lower viral recovery due to the high concentration of algae (compared with untreated wastewater) could explain the low viral frequency in this site.

Regarding the molecular characterization of RVA, we found strains that clustered with genotypes P[8] and G3. These genotypes have been previously reported in other studies, with G3P[8] being the most prevalent in southern Brazil and corresponding to an equine-like genotype (Gutierrez et al., 2020). However, in our study, we did not

observed a high genetic diversity in RVA strains, since only one VP4 and one VP7 genotype were detected. This limited diversity could be due to the small sample size of our study, which included only 36 samples or maybe because of the predominance of this two genotypes. It has been observed that both the P[8] and G3 genotype continue to circulate in our country (Tort et al., 2015a, 2015b). Unfortunately, several samples detected by qPCR were not detected by nested PCR since the quantitative approach presents a higher sensitivity (Zeng et al., 2008).

Our study found a higher frequency of NoV GII compared to GI, which is in agreement with the previous studies based on clinical samples reporting a higher frequency of gastroenteritis outbreaks caused by GII than GI (Matthews et al., 2012; Parikh et al., 2020).

Regarding the molecular characterization of NoV GI, we observed a high genetic variability detecting genotypes GI.2, GI.5, GI.6, GI.3, and GI.7. Specifically, we detected GI.5 in Fray Bentos during January and February 2018, which suggests the occurrence of at least one outbreak in this city during that period. Similarly, we observed the circulation of GI.7 in Salto during October to December 2017. In contrast, the detection of NoV GII revealed the presence of genotypes GII.2, GII.5, GII.6, and GII.4, with the predominance of GII.4, variants New Orleans 2009 and Sydney 2012, which is consistent with a study conducted in Brazil (Hernandez et al., 2018). Several studies, including Huang et al. (2022) reported the detection of NoV GI.2, GI.5, and GI.3, with the more recent detection of genotype GI.6 at a high frequency since 2014. In our study, we also observed the presence of genotypes GI.2, GI.5, GI.3, and GI.6, but with the additional detection of genotype GI.7. For NoV GII, the frequently detected genotypes include GII.4, GII.17, GII.2, GII.3, and GII.13, while in our study we detected the presence of genotypes GII.2, GII.5, GII.6, and GII.4, with the latter two being detected in both studies. Since 2012, the GII.4 Sydney 2012 variant has been the most commonly detected strain in wastewater and has been associated with VAGE outbreaks worldwide. These findings are in agreement with recent molecular epidemiological analyses of NoV over the past 5 years (Zhou et al., 2020; Cannon et al., 2021; Utsumi et al. 2021; Huang et al., 2022).

Comparing our study with a previous one performed by our team in 2011–2012 in our country, it is observed that NoV GI.8, GI.6, GI.5, and GI.7 were previously circulating but they were not detected in the present study. NoV GI.3 continued circulating and GI.7 and GI.2 currently circulate but were absent in 2011–2012. Regarding NoV GII, GII.3, GII.13, GII.17, and GII.1 no longer circulate compared to the previously work. GII.4, GII.2, and GII.6 continue to circulate while other genotypes were not detected (Lizasoain et al., 2015; Victoria et al. 2016).

In addition, co-circulation of different NoV genotypes within a defined human population during the same period provides opportunities for genetic recombination between strains (Wei et al., 2021). Our study detected the presence of both NoV GI and GII strains in the same sample collected in February 2018 and August 2017 in Fray Bentos, as well as in May 2017 in Salto, suggesting the co-circulation of these two genotypes in the same city at the same time.

By analyzing the HAstV stains, we observed only the presence of MLB1 genotype. In a previous study performed in Uruguay the presence of MLB1 was also observed (Lizasoain et al., 2015). On the other hand, in a study with wastewater in Japan, MLB2, VA1, and VA2 genotypes were identified (Hata et al., 2015). Moreover, in the United States, only types 1 and 2 MLB-AstVs were identified from the wastewater samples collected, whereas all known genotypes of MLB-AstVs (types 1–3) were found from the samples collected in Nepal (Hata et al., 2018). These findings suggest the wide distribution of until recently called emergent HAstV.

Conclusions

Our study revealed the circulation of RVA, NoV GI, NoV GII, and HAstV in wastewater reflecting their circulation in the population served by the sewerage network present in the analyzed cities. Only a single genotype for each analyzed gene (VP4 and VP7) of RVA was observed. A high genetic diversity was detected for NoV, with the co-circulation of several genotypes in both Genogroup I and Genogroup II. HAstV showed low variability, with only one genotype detected. We observed that several genotypes that were circulating in 2011–2012 were also present in 2017–2018 but others were only present in one of the analyzed period. It is important to highlight that, in a general way, the strains detected in this study were more similar to contemporary strains circulating in neighboring countries than strains detected in our country in 2011–2012.

Acknowledgements We would like to thank the financial support for this project by Fondo Clemente Estable (FCE_1_2017_1_136092) of the National Agency of Research and Innovation (ANII), Uruguay. We also want to thank Dr. Moller and Dr. Thomson from Biological Chemistry Institute, School of Sciences, UdelaR, for their technical assistance with ultracentrifugation procedure.

Author contributions Conceived the study: MV and RC. Wrote the manuscript: VB. Performed the laboratory experiments: VB and MS. Performed the bioinformatic analysis: DM and VB. Supervised data, collection and laboratory work: MV and RC. Critical reviewed the manuscript: VB, MS, DM, RC and MV. All authors read and approved the final manuscript.

Declarations

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Afewerk, D. T., Shumie, M. K., Endalew, G. F., Adugna, A. G., & Tarekegn, B. G. (2022). Pooled prevalence and genetic diversity of norovirus in Africa: A systematic review and meta-analysis. *Virology Journal*, 19(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01835-w>
- Aguiar-Oliveira, M. L., Campos, A., Matos, A. R., Rigotto, C., Sotero-Martins, A., Teixeira, P. F. P., & Siqueira, M. M. (2020). Waste-water-based epidemiology (WBE) and viral detection in polluted surface water: A valuable tool for COVID-19 surveillance—A brief review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24), 9251. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249251>
- Arowolo, K. O., Ayolabi, C. I., Adeleye, I. A., Lapinski, B., Santos, J. S., & Raboni, S. M. (2020). Molecular epidemiology of astrovirus in children with gastroenteritis in southwestern Nigeria. *Archives of Virology*, 165(11), 2461–2469. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04741-0>
- Atabakhsh, P., Kargar, M., & Doosti, A. (2020). Molecular detection and genotyping of group A rotavirus in two wastewater treatment plants, Iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(1), 197–203. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00131-0>
- Barril, P. A., Giordano, M. O., Isa, M. B., Masachessi, G., Ferreyra, L. J., Castello, A. A., Glikmann, G., & Nates, S. V. (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. <https://doi.org/10.1002/jmv.21800>
- van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D. J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., Di Bartolo, I., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., ... Koopmans, M. P. G. (2018). NoroNet. Molecular surveillance of norovirus, 2005–2016: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(5), 545–553. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30059-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30059-8)
- Bitencourt, E. L. R., Siqueira, J. A. M., Medeiros, T. B., Bandeira, R. D. S., de Souza Oliveira, D., de Paula Souza E Guimarães, R. J., da Silva Soares, L., Macarenhas, J. D. P., Teixeira, D. M., Silva, R. S. U., Loureiro, E. C. B., de Moraes Silva, M. C., da Silva, L. D., & Gabbay, Y. B. (2019). Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: A retrospective study. *Journal of Medical Virology*, 91(6), 997–1007. <https://doi.org/10.1002/jmv.25395>
- Blanco Fernández, M. D., Barrios, M. E., Cammarata, R. V., Torres, C., Taboga, O. A., & Mbayed, V. A. (2017). Comparison of internal process control viruses for detection of food and waterborne viruses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4289–4298. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8244-2>
- Bortagaray, V., Lizasoain, A., Piccini, C., Gillman, L., Berois, M., Pou, S., Díaz, M. D. P., Tort, F. L., Colina, R., & Victoria, M. (2019). Microbial source tracking analysis using viral indicators in Santa Lucía and Uruguay rivers, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 11(3), 259–267. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09384-2>
- Bányai, K., Estes, M. K., Martella, V., & Parashar, U. D. (2018). Viral gastroenteritis. *The Lancet*, 392(10142), 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0)
- Cannon, J. L., Bonifacio, J., Bucardo, F., Buesa, J., Bruggink, L., Chan, M. C., Fumian, T. M., Giri, S., Gonzalez, M. D., Hewitt, J., Lin, J. H., Mans, J., Muñoz, C., Pan, C. Y., Pang, X. L., Pietsch, C., Rahman, M., Sakon, N., Selvarangan, R., ... Vinjé, J. (2021). Global trends in norovirus genotype distribution among children with acute gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 27(5), 1438–1445. <https://doi.org/10.3201/eid2705.204756>
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The Journal of General Virology*, 100(10), 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>. Erratum in: *The Journal of General Virology* 2020;101(8), 893.
- Dai, Y. C., Xu, Q. H., Wu, X. B., Hu, G. F., Tang, Y. L., Li, J. D., Chen, Q., & Nie, J. (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.
- Eftim, S. E., Hong, T., Solter, J., Boehm, A., Warren, I., Ichida, A., & Nappier, S. P. (2017). Occurrence of norovirus in raw sewage: A systematic literature review and meta-analysis. *Water Research*, 111, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.017>
- Estes, M. K., & Greenberg, H. B. (2013) Rotaviruses. In: *Fields virology*, 6th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Farkas, K., Marshall, M., Cooper, D., McDonald, J. E., Malham, S. K., Peters, D. E., Maloney, J. D., & Jones, D. L. (2018). Seasonal and diurnal surveillance of treated and untreated wastewater for human enteric viruses. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(33), 33391–33401. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3261-y>
- Finkbeiner, S. R., Holtz, L. R., Jiang, Y., Rajendran, P., Franz, C. J., Zhao, G., Kang, G., & Wang, D. (2009). Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology Journal*, 6, 161.
- Fioretti, J. M., Ferreira, M. S. R., Victoria, M., et al. (2011). Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 942–947.
- Ghssein, G., Salami, A., Salloum, L., Chedid, P., Joumaa, W. H., & Fakhri, H. (2018). Surveillance study of acute gastroenteritis etiologies in hospitalized children in South Lebanon (SAGE study). *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 21(3), 176–183.
- Guo, Y., Li, J., O'Brien, J., Sivakumar, M., & Jiang, G. (2022). Back-estimation of norovirus infections through wastewater-based epidemiology: A systematic review and parameter sensitivity. *Water Research*, 219, 118610. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118610>
- Gupta, S., Krishnan, A., Sharma, S., Kumar, P., Aneja, S., & Ray, P. (2017). Changing pattern of prevalence, genetic diversity, and mixed infections of viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in New Delhi, India. *Journal of Medical Virology*, 90(3), 469–476.
- Gutierrez, M. B., Fialho, A. M., Maranhão, A. G., Malta, F. C., Andrade, J. D. S. R., Assis, R. M. S., Mouta, S. D. S. E., Miagostovich, M. P., Leite, J. P. G., & Machado, F. T. (2020). Rotavirus A in Brazil: Molecular epidemiology and surveillance during 2018–2019. *Pathogens*, 9(7), 515. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070515>
- Hata, H., Katayama, M., & Kitajima, H. (2015). Furumai, Wastewater analysis indicates that genetically diverse astroviruses, including strains belonging to novel clades MLB and VA, are circulating within Japanese populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 4932–4939. <https://doi.org/10.1128/AEM.00563-15>
- Hata, A., Kitajima, M., Haramoto, E., Lec, S., Ihara, M., Gerba, C. P., & Tanaka, H. (2018). Next-generation amplicon sequencing identifies genetically diverse human astroviruses, including

- recombinant strains, in environmental waters. *Scientific Reports*, 8(1), 11837. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30217-y>
- Hellmér, M., Paxéus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergström, T., & Norder, H. (2014). Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6771–6781. <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>
- Hernandez, J. M., Silva, L. D., Junior, E. C. S., Bandeira, R. S., Rodrigues, E. A. M., Lucena, M. S. S., Costa, S. T. P., & Gabbay, Y. B. (2018). Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3068-y>
- Huang, Y., Zhou, N., Zhang, S., Yi, Y., Han, Y., Liu, M., Han, Y., Shi, N., Yang, L., Wang, Q., Cui, T., & Jin, H. (2022). Norovirus detection in wastewater and its correlation with human gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(16), 22829–22842. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18202-x>
- ICTV. (2018). International Committee on Taxonomy of Viruses. Updated in July 2018 and available at <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- I.N.E. Instituto Nacional de Estadística. (2011). Censos2011. <http://www5.inecubuy/censos2011/index.html>. Accessed March 12, 2023.
- Kargar, M., Javdani, N., Najafi, A., & Tahamtan, Y. (2013). First molecular detection of group A rotavirus in urban and hospital sewage systems by nested-RT PCR in Shiraz, Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-11-4>
- Khamrin, P., Thongprachum, A., Okitsu, S., Hayakawa, S., Maneekarn, N., & Ushijima, H. (2016). Multiple astrovirus MLB1, MLB2, VA2 clades, and classic human astrovirus in children with acute gastroenteritis in Japan. *Journal of Medical Virology*, 88(2), 356–360. <https://doi.org/10.1002/jmv.24337>
- 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. *Environmental Science and Technology*, 44, 7116–7122.
- Lin, X., Zou, R., Liu, Y., Ji, F., Tao, Z., & Xu, A. (2021). Continuous detection of norovirus and astrovirus in wastewater in a coastal city of China in 2014–2016. *Letters in Applied Microbiology*, 73(4), 418–425. <https://doi.org/10.1111/lam.13530>
- Lizasoain, A., Tort, L. F., García, M., Gómez, M. M., Cristina, J., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., Victoria, M., & Colina, R. (2015). Environmental assessment of classical human astrovirus in Uruguay. *Food and Environmental Virology*. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9186-4>
- Lum, S., et al. (2016). An emerging opportunistic infection: Fatal astrovirus (VA1/HMO-C) encephalitis in a pediatric stem cell transplant recipient. *Transplant Infectious Disease*, 18(6), 960–964.
- Maes, P., Matthijnsens, J., Rahman, M., & Van Ranst, M. (2009). RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiology*, 9, 1–4.
- Mao, K., Zhang, H., Pan, Y., & Yang, Z. (2021). Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. *Water Research*, 191, 116787. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116787>
- Matthews, J. E., Dickey, B. W., Miller, R. D., Felzer, J. R., Dawson, B. P., Lee, A. S., Rocks, J. J., Kiel, J., Montes, J. S., Moe, C. L., Eisenberg, J. N., & Leon, J. S. (2012). The epidemiology of published norovirus outbreaks: A review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiology & Infection*, 140(7), 1161–1172. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000234>
- Pang, X. L., Preiksaitis, J. K., & Lee, B. (2005). Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, 33(2), 168–171.
- Parikh, M. P., Vandekar, S., Moore, C., Thomas, L., Britt, N., Piya, B., Stewart, L. S., Bataarseh, E., Hamdan, L., Cavallo, S. J., Swing, A. M., Garman, K. N., Constantine-Renna, L., Chappell, J., Payne, D. C., Vinjé, J., Hall, A. J., Dunn, J. R., & Halasa, N. (2020). Temporal and genotypic associations of sporadic norovirus gastroenteritis and reported norovirus outbreaks in middle Tennessee, 2012–2016. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9), 2398–2404. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1106>
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3376–3382.
- Prevost, B., Lucas, F. S., Ambert-Balay, K., Pothier, P., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2015). Deciphering the diversities of astroviruses and noroviruses in wastewater treatment plant effluents by a high-throughput sequencing method. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7215–7222. <https://doi.org/10.1128/AEM.02076-15>
- RCWG. 2018. Web site: Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Newly assigned genotypes, List of accepted genotypes (Updated: June-30-2017). <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>
- Schultz, A. C., Vega, E., Dalsgaard, A., Christensen, L. S., Nørrung, B., Hoorfar, J., & Vinjé, J. (2011). Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Clinical Virology*, 50(3), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.12.001>
- Shamkhali Chenar, S., & Deng, Z. (2017). Environmental indicators for human norovirus outbreaks. *International Journal of Environmental Health Research*, 27(1), 40–51. <https://doi.org/10.1080/09603123.2016.1257705>
- Silva-Sales, M., Martínez-Puchol, S., Gonzales-Gustavson, E., Hunders, A., & Gironès, R. (2020). High prevalence of rotavirus A in raw sewage samples from northeast Spain. *Viruses*, 12(3), 318. <https://doi.org/10.3390/v12030318>
- Tavakoli Nick, S., Mohebbi, S. R., Hosseini, S. M., Mirjalali, H., & Alebouyeh, M. (2020). Monitoring of rotavirus in treated wastewater in Tehran with a monthly interval, in 2017–2018. *Journal of Water and Health*, 18(6), 1065–1072. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.112>
- Tort, L. F., Victoria, M., Lizasoain, A. A., Castells, M., Maya, L., Gómez, M. M., Arreseigor, E., López, P., Cristina, J., Leite, J. P., & Colina, R. (2015a). 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. <https://doi.org/10.1002/jmv.24123>
- Tort, L. F., Victoria, M., Lizasoain, A., García, M., Berois, M., Cristina, J., Leite, J. P., Gómez, M. M., Miagostovich, M. P., & Colina, R. (2015b). Detection of common, emerging and uncommon VP4, and VP7 human group A rotavirus genotypes from urban sewage samples in Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 7(4), 342–353. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9213-5>
- Utsumi, T., Lusida, M. I., Dinana, Z., Wahyuni, R. M., Soegijanto, S., Athiyyah, A. F., Sudarmo, S. M., Ranuh, R. G., Darma, A., Yamani, L. N., Doan, Y. H., Shimizu, H., Ishii, K., Matsui, C., Deng, L., Abe, T., Katayama, K., & Shoji, I. (2021). Molecular epidemiology and genetic diversity of norovirus infection

- in children hospitalized with acute gastroenteritis in East Java, Indonesia in 2015–2019. *Infection, Genetics and Evolution*, 88, 104703. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104703>
- Verbyla, M. E., & Mihelcic, J. R. (2015). A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research*, 71, 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.031>
- Victoria, M., Tort, L. F., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., Cristina, J., & Colina, R. (2014). Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 6(2), 116–124. <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9143-7>
- Victoria, M., Tort, L. F., Lizasoain, A., García, M., Castells, M., Beriois, M., Divizia, M., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., Cristina, J., & Colina, R. (2016). Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1427–35. <https://doi.org/10.1111/jam.13058>
- Vu, D. L., Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2017). Epidemiology of classic and novel human astrovirus: Gastroenteritis and beyond. *Viruses*, 9(2), 33. <https://doi.org/10.3390/v9020033>
- WHO. (2017). Diarrhoeal disease. Accessed July 25th, 2023 in <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- WHO. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods. Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/08.17. www.who.int/vaccines-documents/
- Wei, N., Ge, J., Tan, C., Song, Y., Wang, S., Bao, M., & Li, J. (2021). Epidemiology and evolution of Norovirus in China. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(11), 4553–4566. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1961465>
- Yu, F., Jiang, B., Guo, X., Hou, L., Tian, Y., Zhang, J., Li, Q., Jia, L., Yang, P., Wang, Q., Pang, X., & Gao, Z. (2022). Norovirus outbreaks in China, 2000–2018: A systematic review. *Reviews in Medical Virology*, 32(6), e2382. <https://doi.org/10.1002/rmv.2382>
- Zeng, S. Q., Halkosalo, A., Salminen, M., et al. (2008). One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, 153(2), 238–240.
- Zhou, H., Wang, S., von Seidlein, L., & Wang, X. (2020). The epidemiology of norovirus gastroenteritis in China: Disease burden and distribution of genotypes. *Frontiers of Medicine*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11684-019-0733-5>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Capítulo II: “Estudio de la circulación de diferentes estirpes de virus gastroentéricos en poblaciones ribereñas del Río Uruguay mediante secuenciación de nueva generación”

Objetivo: Realizar la caracterización molecular de las estirpes virales, en aguas residuales por medio de diferentes técnicas de secuenciación en ciudades ribereñas del Río Uruguay.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad genética de Rotavirus, Norovirus y Astrovirus en aguas residuales de Salto, Bella Unión y Fray Bentos mediante la secuenciación de nueva generación (NGS), con el fin de comprender la circulación de estos virus en las poblaciones ribereñas al río Uruguay. Se colectaron muestras mensuales de aguas residuales, que fueron analizadas por PCR y secuenciadas por la tecnología Illumina Miseq. Se lograron identificar cepas pertenecientes a los genotipos P8 y G3 para RVA, GII.4 y GII.2 para Norovirus y MLB1, MLB2 y HAstV-1 para AstV humanos. La secuenciación de aguas residuales mediante NGS permitió identificar la circulación de diferentes genotipos de Rotavirus, Norovirus y Astrovirus en las ciudades de Bella Unión, Salto y Fray Bentos. Estos hallazgos resaltan la importancia de realizar estudios de epidemiología molecular en aguas residuales, principalmente en países como Uruguay, donde los recursos para la vigilancia de patógenos son limitados, y este enfoque ofrece una alternativa más accesible y eficiente para el monitoreo de enfermedades infecciosas.

Introducción

La gastroenteritis aguda (GA) es un problema de salud significativo y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población infantil de los países en desarrollo. Aunque afecta a personas de todas las edades, su impacto es especialmente grave en niños y adultos mayores, donde se estima que los virus son responsables de aproximadamente el 80% de los casos de GA a nivel mundial encontrándose dentro de este grupo a los rotavirus, astrovirus, adenovirus y

calicivirus (Dominguez et al., 2009). La detección e identificación temprana y precisa de dichos patógenos es esencial para el seguimiento epidemiológico, el manejo y la reducción de la incidencia de enfermedades asociadas a estos patógenos, así como también para conocer cuáles son las variantes que están circulando en la población en estudio para que los organismos que están encargados de cuidar la salud de la población, puedan tomar medidas que mitiguen su impacto (Nafea et al., 2024). En este contexto, los virus de ARN, como Rotavirus (RVA), Norovirus (NoV) y Astrovirus (HAstV), presentan una particularidad relevante: su alta tasa de mutación debido a la baja fidelidad de su ARN polimerasa, lo que les permite escapar de las defensas del huésped y evolucionar rápidamente, generando una gran variabilidad genética y nuevas variantes, que dificulta su control, monitoreo y les permite una rápida diseminación en las poblaciones vulnerables (Zhao et al., 2016).

Dichos virus conocidos también como de transmisión hídrica, presentan una ruta de transmisión fecal-oral, así como también pueden persistir en el agua superficial y el ambiente por más tiempo que las bacterias (Gersberg et al., 2006). Es por esto que las enfermedades relacionadas con el agua pueden transmitirse de diversas maneras, no solo por su consumo o uso recreativo, sino también a través del riego de cultivos y el procesamiento de alimentos lo que puede provocar brotes de gastroenteritis transmitidos por alimentos y aguas contaminadas (Bosch et al., 2008). Durante las temporadas estivales de recreación, el agua utilizada con fines recreativos es una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales agudas (Sanborn & Takaro, 2013). Por ello, es fundamental implementar medidas de control y monitoreo para reducir el riesgo de transmisión de estas enfermedades.

Estudios previos han demostrado el potencial de la NGS para identificar y caracterizar la variabilidad genética de virus como RVA, NoV y HAstV en aguas residuales en lo que se conoce como epidemiología basada en las aguas residuales (WBE) (Zhu et al., 2022; Stauber et al., 2024; Zhou et al., 2024; Zulli et al 2024). A nivel mundial existen diversos estudios en esta temática. En un trabajo realizado por Du y colaboradores (2021) en Jian, China donde se eligieron 2 muestras de aguas residuales las cuales fueron secuenciadas

mediante NGS, se detectaron para RVA un total de 9 genotipos G y 13 genotipos P donde el análisis filogenético mostró que los tipos dominantes G9 y P[8] estaban estrechamente relacionados con secuencias derivadas de humanos. En otro trabajo realizado en Roma, Italia con muestras de aguas residuales de un periodo de muestreo de 5 años, se estudió la prevalencia de Norovirus GII y se observó que mediante secuenciación por NGS se detectaron 3 genotipos adicionales considerados poco comunes a nivel mundial: GII.5, GII.16 y GII.21 respecto a los que se habían detectado por la metodología de Sanger (Sufredini et al., 2017). En otro, realizado por Fumian y colaboradores (2019) con muestras de aguas residuales de la ciudad de Rio de Janeiro y secuenciación con tecnología de NGS, se observó una gran variabilidad de genotipos de NoV GII con predominancia de GII.4 y detección del genotipo emergente GII.17 como el segundo más prevalente. En lo que se refiere a trabajos sobre genotipificación mediante NGS de astrovirus, Tao y colaboradores (2022), observaron una gran diversidad de genotipos e incluso linajes nuevos en aguas residuales en China, demostrando que la vigilancia ambiental basada en NGS es una herramienta que puede contribuir de una manera eficaz a conocer acerca de la circulación de diferentes genotipos (mayoritarios y minoritarios) en poblaciones a través del estudio de sus aguas residuales. Con el fin de investigar la circulación de HAstV durante la pandemia de COVID-19, se realizó una vigilancia ambiental con muestras de aguas residuales en China entre 2020 y 2021, donde se observó la presencia de 11 tipos de HAstV, incluidos HAstV-1, -2, -4, -5, MLB1, VA1 a VA6, así como astrovirus animales no humanos (Lin et al., 2024). A pesar del creciente uso de la tecnología NGS en el estudio de los virus gastroentéricos a nivel mundial, la circulación de estos tres virus en aguas residuales en nuestra región ha sido escasamente abordada con esta herramienta, siendo este estudio el primero de este tipo en Uruguay, lo que representa una oportunidad importante para poder ampliar el conocimiento en este campo, identificando mediante la metodología de NGS en muestras de aguas residuales cuales genotipos circulan en las poblaciones estudiadas.

El objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad genética de Rotavirus, Norovirus GI y GII y Astrovirus emergentes presentes en las aguas residuales de las ciudades de Salto, Bella Unión y Fray Bentos mediante la tecnología de NGS,

para obtener una imagen de la circulación de estos virus en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay presentes en estas ciudades con un enfoque de epidemiología basado en el estudio de las aguas residuales. Estos resultados de la circulación de diferentes estirpes virales buscan mejorar la vigilancia epidemiológica y comprender mejor la dinámica de estos virus en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay, la cual es poco entendida debido a la escasa información epidemiológica existente en casos clínicos con respecto a estas virosis en nuestro país.

Materiales y Métodos

De marzo de 2017 a febrero de 2018, se colectaron muestras mensuales de aguas residuales en tres ciudades ribereñas del Río Uruguay (Bella Unión, Salto y Fray Bentos) que vierten estas aguas (tratadas o no) a dicho Río. Las muestras de Salto y Fray Bentos se colectaron desde un caño colector único de cada ciudad, desde donde se vertían directamente las aguas residuales no tratadas de estas ciudades al Río Uruguay. En la ciudad de Bella Unión, las muestras de aguas residuales fueron colectadas luego del tratamiento en un sistema de dos estanques de estabilización en un arroyo receptor de dichas aguas (punto localizado a 30 metros de estos estanques). Posteriormente, las muestras fueron concentradas mediante el método de ultracentrifugación descrito por Pina y colaboradores (1998). Dicha actividad fue realizada en la Facultad de Ciencias en el Instituto de Química Biológica dirigido por la Dra. Leonor Thompson. Brevemente, se centrifugaron 42 ml de muestra a 100.000 $\times$ g durante 1 h a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 3,5 ml de tampón glicina 0,25 N (pH 9,5) y se incubó en hielo durante 30 minutos con agitación cada 5 minutos. Luego, se agregaron 3,5 ml de PBS 2X (pH 7,2), se mezcló y se centrifugó a 12.000 $\times$ g durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió rápidamente a un tubo de ultracentrifugación y se realizó otra centrifugación a 100.000 $\times$ g durante 1 h a 4 °C y el sobrenadante fue rápidamente descartado. El sedimento se resuspendió en 200 μ L de PBS 1X y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis. El ARN viral se extrajo a partir de 140 μ L del concentrado utilizando el kit comercial QIAamp Viral RNA según el protocolo descrito por el fabricante (Qiagen Inc.,

Hilden, Alemania). El ARN viral purificado se eluyó en 30 µL de tampón de elución y se almacenó a -80 °C hasta la transcripción reversa (RT) para obtener ADN complementario, en la cual se utilizó la transcriptasa reversa SuperScript II y cebadores hexámeros aleatorios (ambos de Invitrogen™, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Para esto se utilizó tanto los ácidos nucleicos puros como también una dilución 1 en 10 de estos ácidos nucleicos con el fin de eliminar inhibidores enzimáticos presentes en las aguas residuales. Posteriormente se realizaron las PCRs como se describe a continuación.

PCR para la caracterización molecular de Norovirus

Se realizaron dos reacciones de PCR semi-anidadas (semi-nested PCRs) para la detección de los genotipos GI y GII de NoV. Para GI se utilizaron los cebadores COG1F/G1SKR y G1SKF/G1SKR para el primer (380 pb) y segundo (330 pb) ciclo de amplificación, respectivamente. Para los genotipos GII se utilizaron los cebadores COG2F/G2SKR y G2SKF/G2SKR para el primer (390 pb) y segundo (340 pb) ciclo, respectivamente. Estos cebadores hibridan en la región de la unión ORF1/ORF2 y la región 5' del ORF2, que codifica la cápside viral, permitiendo la identificación de los genotipos y variantes dentro de los genogrupos correspondientes. Las condiciones de las PCRs fueron 94 °C por 3 minutos seguido de 40 ciclos de 94 °C 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y una extensión a 72 °C por 10 minutos (Kitajima et al. 2010).

PCR para la caracterización molecular de los Astrovirus.

La detección de los HAsTV emergentes se realizó por medio de una PCR con los cebadores SF0073 y SF0076 dirigidos a una región genómica codificante de la ARN polimerasa viral obteniendo un fragmento de 409 pb. Las condiciones de la PCR fueron 94 °C por 3 minutos seguido de 40 ciclos de 94 °C 30 segundos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y una extensión a 72 °C por 10 minutos (Finkbeiner et al. 2009).

PCR para la caracterización molecular de los Rotavirus del grupo A

Para este virus, se utilizaron dos PCR anidadas (nested PCR) para los genotipos G y P de los genes VP7 y VP4, respectivamente (WHO, 2009). En el primer ciclo de las PCR anidadas, se utilizaron los cebadores 9con1/9con2 para el genotipo G (condiciones de la PCR: 94 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 50 °C 30 segundos y 72 °C 1 minuto, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos) y 4con2/4con3 para el genotipo P (condiciones de la PCR: 94 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 45 °C 30 segundos y 72 °C 1 minuto, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos). En el segundo ciclo, se emplearon los cebadores internos VP7F/VP7Rdeg (881 pb) para la determinación de los genotipos G (condiciones de la PCR: 94 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 52 °C 30 segundos y 72 °C 1 minuto, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos) y VP4F/VP4R (663pb) para los genotipos P (condiciones de la PCR: 94 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 50 °C 30 segundos y 72 °C 1 minuto, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos).

Secuenciación y análisis filogenéticos

Los productos de las mencionadas PCRs fueron purificados con el kit comercial AxyPrep™ DNA Gel Extraction (AXYGEN®, USA) y se secuenciaron en Macrogen, Corea del Sur, mediante la tecnología Illumina Miseq. Previo al envío de las muestras para su secuenciación, los amplicones de NoV y HAstV fueron pooleados debido a la cantidad de muestras positivas. Cabe destacar que primero se mando el pool denominado AstV otoño y NoVGII que contenían muestras de otoño, las cuales se secuenciaron de forma correcta. Luego se realizaron las restantes PCR para obtener amplicones, y en esa etapa los amplicones ya no se pudieron detectar con tanta claridad, ya que se obtuvieron menos por lo que se decidió juntar el resto de las muestras y armar un pool AstV i-p-v que corresponde al resto de las estaciones del año. Con NoV no se armo otro pool ya que no fue posible obtener amplicones. En el caso de RVA, cada amplicón fue secuenciado de forma individual ya que se obtuvieron escasos amplicones y debido a su largo se debieron tratar con Nextera para ser tagmentados y luego secuenciados (Tabla 1).

Tabla 1- En la tabla se observan las muestras que componen cada pool con su respectiva fecha y lugar al que pertenecen.

Nombre de Pool/Muestra	RVA	HAstV	NoV GII	Lugar	Fecha
A742	G			Fray Bentos	Mayo 2017
A746	G			Fray Bentos	Junio 2017
A756	G			Fray Bentos	Setiembre 2017
A764	G			Fray Bentos	Noviembre 2017
A770	P			Salto	Diciembre 2017
A775	P			Salto	Enero 2018
NoV GII			A732, A736, A741, A742	Fray Bentos, Fray Bentos, Salto, Fray Bentos	Marzo 2017, Abril 2017, Mayo 2017, Mayo 2017
Astro otoño		A740, A742		Bella Unión, Fray Bentos	Mayo 2017, Mayo 2017
Astro i-p-v		A745, A746, A754, A758, A761, A762, A764		Salto, Fray Bentos, Fray Bentos, Salto, Bella Unión, Fray Bentos, Fray Bentos	Junio 2017, Junio 2017, Agosto 2017, Setiembre 2017, Octubre 2017, Octubre 2017, Noviembre 2017

La caracterización de todas las estirpes virales en aguas residuales por medio de la utilización de la tecnología de NGS se realizó como se detalla a continuación. Los productos de PCR para esta secuenciación se obtuvieron mediante cebadores o primers duales compuestos de dos secuencias: el adaptador común (33 – 35 bases) seguido de cebadores dirigidos a genes específicos para cada una de los tres virus. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar con la plataforma MiSeq de Illumina, generando reads pareados de 300 bases con superposición de la zona central de hasta 50 bases, dando un read fusionado con longitud máxima de 550 bases. La longitud de los fragmentos generados en el caso de NoV GII y HAstV está entre 400 y 550 bases. Las bibliotecas se generaron mediante la utilización de los kit TrueSeq Nano DNA

para los amplicones de NoV y HAstV y Nextera DNA XT para los amplicones generados para RVA. Dado que los fragmentos obtenidos de los genes VP4 (663 pb) y VP7 (881 pb) de RVA superaban los 600 pb recomendados para la secuenciación de Illumina MiSeq, se procedió a fragmentar al azar los amplicones mediante tagmentación con el kit Nextera XT. La primera etapa del pipeline aplicado en el análisis de NGS fue común para los tres virus analizados. Esta primera etapa de análisis consistió en el emparejamiento de las lecturas forward y reverse de Illumina utilizando el algoritmo - merge pairs del programa VSEARCH v2.1 (Rognes et al., 2016). Los contigs resultantes se filtraron según si sus longitudes eran <150 pb y si contenían regiones de homopolímero > 8 pb de longitud. El filtro de calidad se realizó mediante el comando - fastq_filter del programa VSEARCH v2.1 y se descartaron los contigs con más de 0.5 errores totales esperados (-fastq_maxee 0.5). Con el fin de ahorrar tiempo en los análisis posteriores, se realizó un paso de dereplicación usando el algoritmo VSEARCH -derep_fulllength en los contigs procesados para fusionar secuencias estrictamente idénticas. Se eliminaron singletons (secuencias que luego de la dereplicación poseen una abundancia = 1) y quimeras. El mapeo de los contigs resultantes de las etapas previas de procesamiento fue realizado contra secuencias de referencia de cada virus/gen analizado. El mapeo de los contigs contra sus respectivos genomas de referencia se realizó utilizando el programa Bowtie 2 v2.3. Los archivos resultantes (Sequence Alignment Map [SAM]) se manipularon con Samtools v1.7. En el caso de RVA los contigs mapeados de cada muestra fueron extraídos y convertidos a un archivo fasta sobre el cual se ejecutó el programa CliqueSNV (Eliseev et al., 2020) para la reconstrucción de la cuasiespecie y la estimación de las frecuencias de los haplotipos. Para NoV y HAstV se definieron unidades taxonómicas operativas (OTUs) utilizando el programa VSEARCH con 0.98% y 0.97% de identidad respectivamente. Este programa lo que hace es agrupar las secuencias que comparten en este caso una identidad del 97% y del 98%, y ahí se define una OTU que es la secuencia que se parece mas a todas las que componene ese centroide. Finalmente los centroides de cada OTU fueron mapeados contra sus respectivas secuencias de referencia. Se utilizó el mapeo previo a la definición de OTUs como control para la definición de los porcentajes de identidad de la formación de las OTUs. Los porcentajes de identidad finalmente utilizados fueron aquellos para los cuales el mapeo de los centroides resultó en la misma diversidad que el mapeo de los contigs sin

agrupar. El centroide se selecciona como la secuencia más cercana al "centro" del grupo de secuencias. Las secuencias correspondientes a los haplotipos reconstruidos por CliqueSNV para RVA y los centroides mapeados de NoV y HAsV fueron sujetos a análisis filogenético por Máxima Verosimilitud (MV) utilizando el programa IQTREE v1.6.12 (<http://www.iqtree.org/release/v1.6.12>) bajo el modelo de sustitución de nucleótidos según lo seleccionado por la aplicación ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017), y el soporte de la rama se evaluó mediante SHaLRT (*Shimodaira-Hasegawa Approximate Likelihood Ratio Test*) con 1000 réplicas. Los árboles filogenéticos se visualizaron utilizando el programa FigTree v1.4

Los modelos evolutivos fueron: para VP4 y VP7 el modelo GTR+I+G. Para NoV GII y HAsV emergentes el modelo fue SYM+I+G4.

Resultados

En el presente trabajo se estudió la diversidad genética de los RVA, NoV GI y GII y HAsV emergentes por medio de la metodología de Illumina MiSeq a partir de muestras de aguas residuales de ciudades ribereñas del Río Uruguay utilizando un enfoque de Epidemiología Basada en las Aguas Residuales.

Caracterización molecular de Rotavirus

De un total de 36 muestras colectadas, se lograron amplificar y purificar para ser enviadas a secuenciar por la tecnología Illumina Miseq un total de 6 muestras, de las cuales 2 correspondieron a VP4 y 4 a la amplificación para VP7.

Para VP4 se obtuvieron los fragmentos de las muestras A770 correspondiente a la colecta realizada en diciembre 2017 en la ciudad de Salto y la muestra A775 de la misma ciudad correspondiente a enero 2018.

Para las muestras A770 y A775, se generaron 580.212 y 547.242 reads, respectivamente, tras la secuenciación. Luego de aplicar los procedimientos de merging y filtrado bioinformático, se obtuvieron 49.583 contigs exclusivos de RVA para la muestra A770 y 29.750 contigs exclusivos de RVA para la muestra A775. Estos contigs fueron utilizados para la reconstrucción de haplotipos y la inferencia filogenética, lo que permitió la caracterización de las estirpes virales. Los detalles del número de reads en cada etapa del procesamiento se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución de los reads obtenidos para VP4 en cada una de las etapas de su procesamiento desde la obtención del archivo FastQ hasta el mapeo.

Muestra	Nº reads	Merged	Filtrado calidad	Filtrado homopolímeros	Dereplicación	Denoising	Quimeras	Mapeo
A770	580.212	534.366	479.391	479.391	305.781	49.590	49.588	49.583
A775	547.242	503.361	451.155	451.155	249.258	29.757	29.756	29.750

Con los haplotipos obtenidos de los análisis bioinformáticos y secuencias de referencia se infirieron los árboles filogenéticos. En el caso de VP4, en el árbol filogenético se puede observar que ambas muestras (A770 y A775) agruparon con estirpes de referencia pertenecientes al genotipo P8 (figura 3).

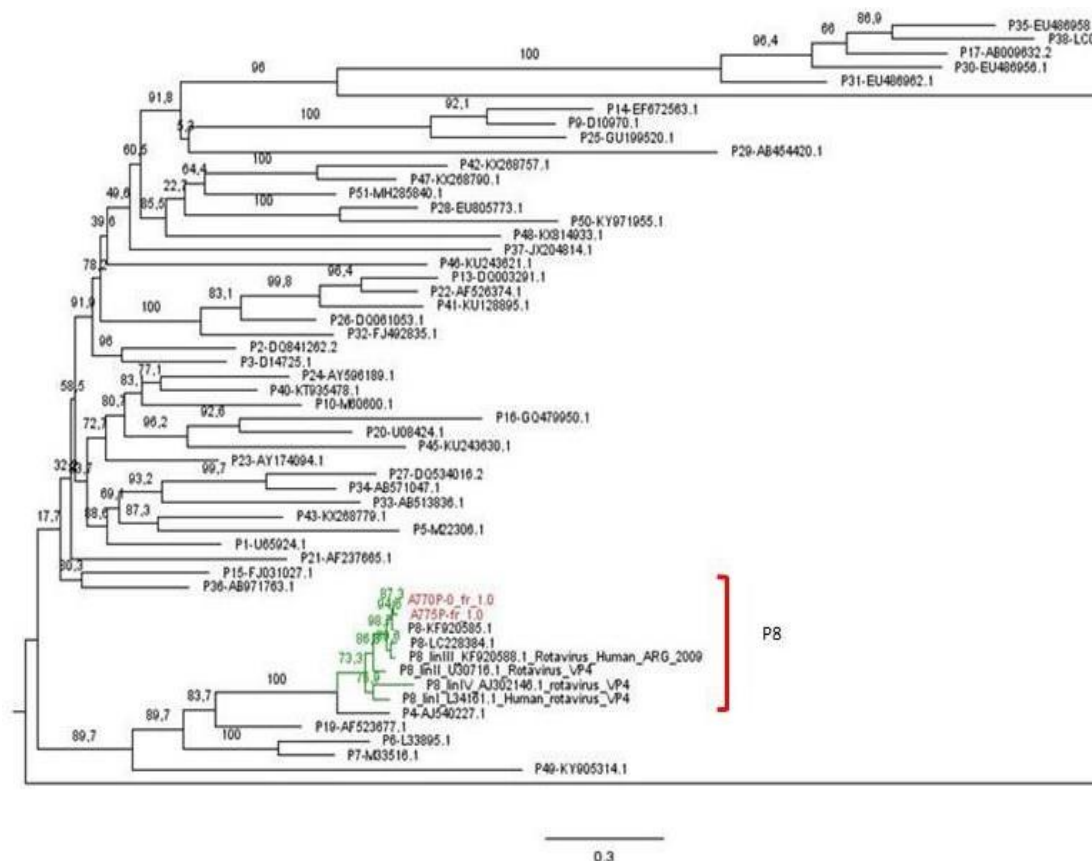


Figura 3. Análisis filogenético de la región parcial del gen VP4 (663 pb) mediante secuenciación con tecnología Illumina MiSeq. La inferencia filogenética se llevó a cabo utilizando el programa IQtree, aplicando el método de Máxima Verosimilitud (MV) con soporte de ramas basado en 1.000 réplicas de SH-aLRT (Shimodaira-Hasegawa Approximate Likelihood Ratio Test). Las secuencias obtenidas en este estudio se representan en rojo, mientras que las secuencias de referencia se muestran en negro.

Para VP7 se obtuvieron los fragmentos de las muestras A742 correspondiente a la colecta realizada en mayo, la A746 de junio, la A756 de setiembre y la muestra A764 de noviembre, todas correspondientes al 2017 y a la ciudad de Fray Bentos.

La muestra A742 obtuvo luego de la secuenciación 363.581 *reads* que luego de los diferentes filtrados se obtuvieron un final de 20.845 *reads*, para la muestra A746, se partió de 180.428 *reads* que luego del filtrado se obtuvieron 9.178 *reads*. La muestra A756 partió de 571.475 *reads* para luego de los diferentes pasos de filtrados llegar a 34.506 *reads*, mientras que la muestra A764 partió de 540.529 *reads* para llegar a 31.029 *reads*, los que se utilizaron para los análisis

filogenéticos (Tabla 2). El procedimiento realizado para obtener los haplotipos con los cuales se construyeron los árboles filogenéticos fue el mismo que el descrito para VP4. Para la muestra A742 y A746 se obtuvo un haplotipo por muestra, para las muestras A756 se obtuvieron dos haplotipos y para la muestra A764 tres haplotipos con los cuales se realizó la inferencia filogenética.

Tabla 2. Distribución de los *reads* obtenidos para VP7 en cada una de las etapas de su procesamiento.

Muestra	N° reads	Merged	Filtrado calidad	Filtrado homopolimeros	Dereplicación	Denoising	Quimeras	Mapeo
A742	363.581	330.033	288.685	288.684	249.571	29.854	20.853	20.845
A746	180.428	168.993	154.143	154.124	105.191	9.219	9.218	9.178
A756	571.475	547.337	477.714	477.651	307.024	34.559	34.558	34.506
A764	540.529	526.813	465.466	465.458	285.631	31.034	31.034	31.029

En relación con la caracterización molecular basada en el gen VP7, el análisis filogenético reveló que todas las secuencias (A742, A746, A756 y A764) se agruparon con cepas de referencia correspondientes al genotipo G3, linaje III, previamente descritas en un estudio realizado en aguas residuales en Uruguay en el año 2013. Además, se observó una estrecha relación filogenética con una cepa canina reportada con anterioridad (Figura 4). Las muestras analizadas fueron obtenidas en la ciudad de Fray Bentos, lo que sugiere que este genotipo estuvo en circulación en dicha localidad durante los meses de mayo, junio, setiembre y noviembre de 2017.

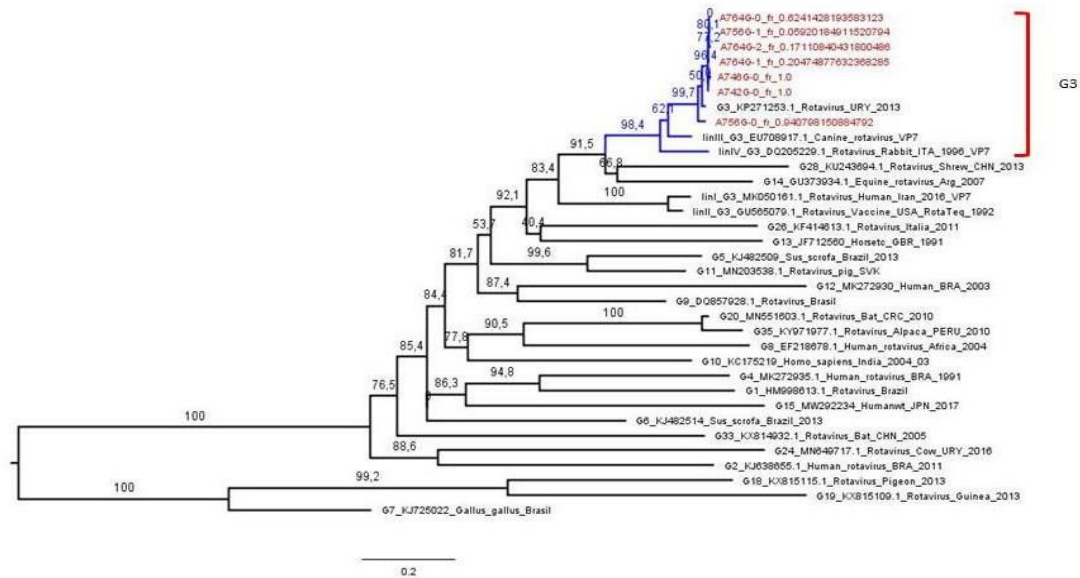


Figura 4. Análisis filogenético para la región parcial del gen VP7 (881 pb) por secuenciación por NGS (Illumina Miseq). La inferencia filogenética se llevó a cabo utilizando el programa IQtree, aplicando el método de Máxima Verosimilitud (MV) con soporte de ramas basado en 1.000 réplicas de SH-aLRT (Shimodaira-Hasegawa Approximate Likelihood Ratio Test). Se observa en rojo las muestras secuenciadas en este estudio y en negro las secuencias de referencia.

Caracterización molecular de Norovirus

Los amplicones de NoV GI (pool de muestras A735, A740, A741) y NoV GII (pool de muestras A732, A736, A741, A742) que se lograron amplificar mediante las PCRs previamente descritas, fueron enviados a Macrogen, pero solo el amplicón conteniendo el pool correspondiente a NoV GII se pudo secuenciar debido a que el de NoV GI no pasó los controles de calidad que se les realizan previo a la secuenciación, por lo que decidimos no continuar con su análisis y fue descartada.

La muestra “NoV GII” contiene los amplicones de las muestras de aguas residuales de marzo, abril y mayo de 2017, conteniendo un total de cuatro muestras, de las cuales tres corresponden a la ciudad de Fray Bentos y una a la ciudad de Salto. Dicha muestra obtuvo luego de la secuenciación, 222.823 reads que luego de los diferentes filtrados resultó en un total de 11.543 reads a partir

de los cuales se generaron las OTUS (centroides) con los cuales se construyó el árbol filogenético (Tabla 3, Figura 5).

Tabla 3. Distribución de los reads obtenidos para NoV GII en cada una de las etapas de su procesamiento.

Muestra	Nº reads	Merged	Filtrado calidad	Filtrado homopolímeros	Dereplicación	Denoising	Quimeras	Clusters	Mapeo Centroide	Mapeo reads
NoV GII	222.823	199.740	196.571	196.570	151.015	11.730	11.554	51	46	11.543

Para el *pipeline* de la muestra NoV GII con una clusterización del 98% de identidad se generaron 51 OTUS con un 98% de identidad, de las cuales mapearon 46, pero se construyó el árbol filogenético con 45 centroides ya que uno se descartó debido a que en el árbol no presentaba soporte estadístico (Figura 5).

En el árbol filogenético de la Figura 5 se adicionaron además de las secuencias obtenidas por la tecnología de NGS, las secuencias previamente obtenidas por la tecnología de Sanger. Se observa que la mayoría de las secuencias de NoV GII agruparon con el GII.2 (30 centroides por NGS y 4 secuencias por Sanger), seguidas por el genotipo GII.4 variante Sydney 2012 (16 centroides por NGS y 4 secuencias por Sanger).

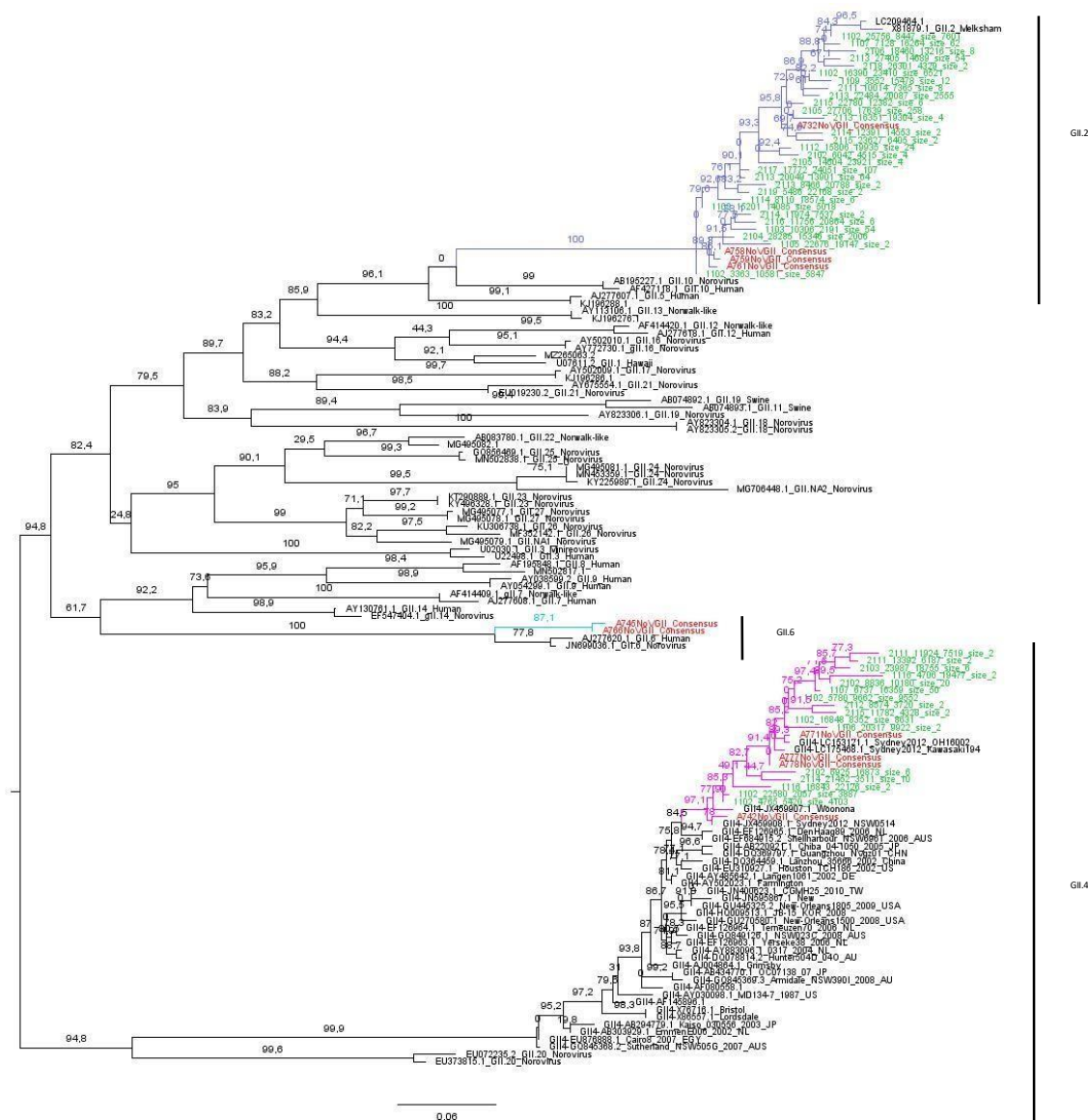


Figura 5. Análisis filogenético para NoV GII de la región parcial de VP1 (390 pb) por secuenciación por NGS (Illumina MiSeq). La inferencia filogenética se llevó a cabo utilizando el programa IQtree, aplicando el método de Máxima Verosimilitud (MV) con soporte de ramas basado en 1.000 réplicas de SH-aLRT (Shimodaira-Hasegawa Approximate Likelihood Ratio Test). Se observa en rojo las muestras secuenciadas por Sanger, en verde por NGS y en negro las secuencias de referencia.

Caracterización molecular de Astrovirus

La secuenciación por NGS para Astrovirus, se realizó en dos muestras diferentes, una denominada AstV i-p-v (invierno-primavera-verano) y la otra AstV otoño. La muestra AstV i-p-v contiene las muestras A745 (Salto, junio 2017), A746 (Fray Bentos, junio 2017), A754 (Fray Bentos, agosto 2017), A758 (Salto,

setiembre 2017), A761 (Bella Unión, octubre 2017), A762 (Fray Bentos, octubre 2017) y A764 (Fray Bentos, noviembre 2017); mientras que AstV otoño está compuesto por las muestras A740 (Salto, diciembre 2017) y A742 (Fray Bentos, mayo 2017).

Para la muestra AstV i-p-v se generaron 4.503 *reads* a partir de 211.468, que fueron utilizados para generar 10 centroides (OTUs) utilizados en el análisis filogenético. En el caso de la muestra AstV otoño su utilizaron 9.798 *reads* a partir de 232.629, los cuales generaron 17 OTUs o centroides que fueron utilizadas en el árbol filogenético (Tabla 4). De forma similar al análisis de NoV, se adicionaron las secuencias previamente obtenidas por Sanger al análisis de las secuencias obtenidas por NGS. Se detectaron tres genotipos diferentes siendo el MLB1 el más frecuente (3 por Sanger, 8 por NGS de otoño y 5 por NGS de invierno-primavera-verano) seguido por MLB2 (2 por NGS de otoño y 3 por NGS de invierno-primavera-verano). Interesantemente fueron identificados astrovirus clásicos del HAstV-1 (2 por NGS de otoño, 2 por NGS de invierno-primavera-verano y 1 por Sanger) y dos secuencias por NGS otoño que si bien agruparon con los genotipos de astrovirus clásicos no fue posible su definición en un genotipo existente (Figura 6). Cabe destacar que la PCR que se realizó para obtener los amplicones que se secuenciaron y genotiparon esta descrita para amplificar astrovirus emergentes.

Tabla 4. Distribución de los reads obtenidos para las muestras de AstV en cada una de las etapas de su procesamiento.

Muestra	Nº reads	Merge d	Filtrado o calidad	Filtrado homopolímeros	Dereplicación	Denoising	Quimeras	Clusters	Mapeo Centroides	Mapeo reads
AstV i-p-v	211.468	186.913	173.314	173.309	101.541	9.629	9.302	38	10	4.503
AstV otoño	232.629	223.174	188.545	188.521	107.650	10.305	10.264	32	17	9.798

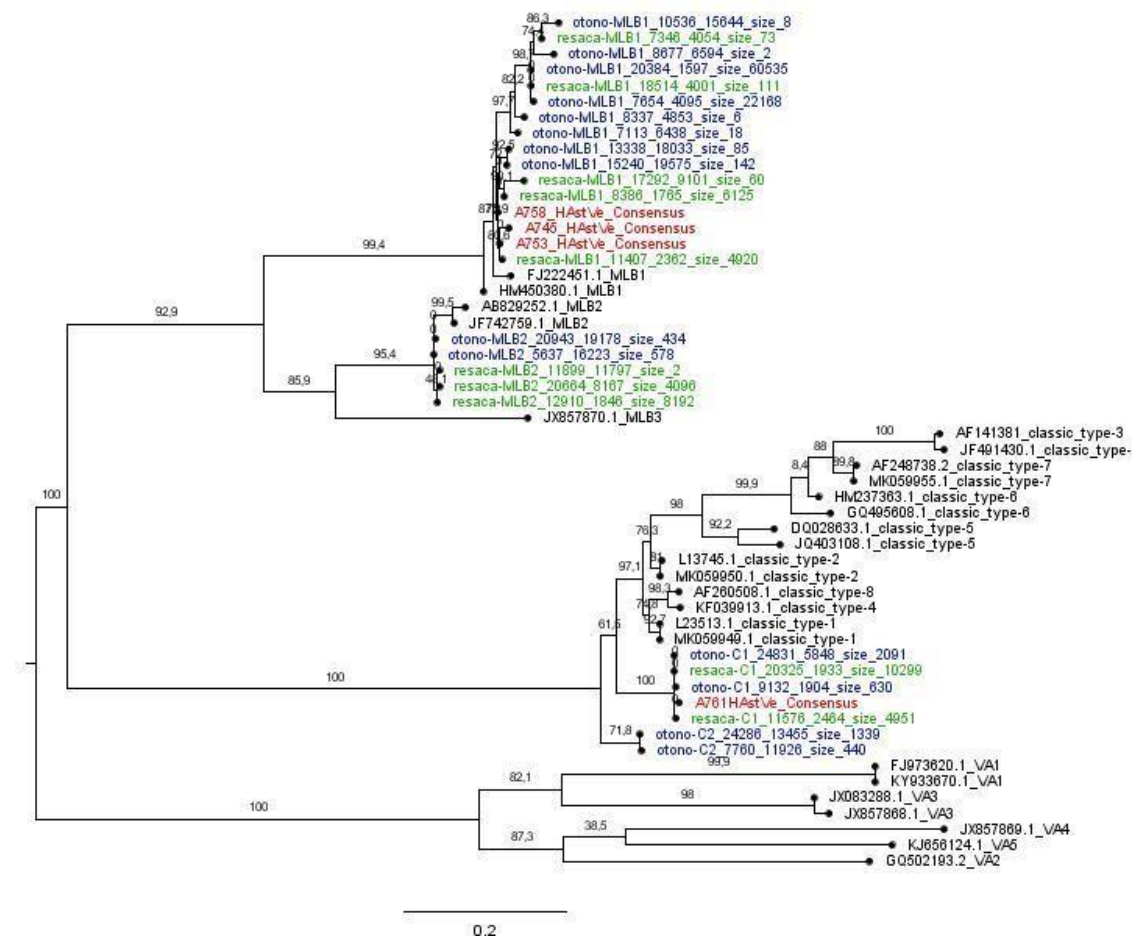


Figura 6. Análisis filogenético de Astrovirus emergentes por medio de la secuenciación de la región parcial de la ARN polimerasa (409 pb) por secuenciación por Sanger y NGS (Illumina MiSeq). La inferencia filogenética se llevó a cabo utilizando el programa IQtree, aplicando el método de Máxima Verosimilitud (MV) con soporte de ramas basado en 1.000 réplicas de SH-aLRT (Shimodaira-Hasegawa Approximate Likelihood Ratio Test). Se observa en rojo las muestras secuenciadas por Sanger, en verde y azul por NGS y en negro las secuencias de referencia.

Discusión y conclusión

En los últimos años la secuenciación de genomas virales por medio de las tecnologías de NGS ha demostrado ser una herramienta cada vez más eficaz en lo que se refiere a su capacidad de secuenciar con mayor profundidad aportando así mucha información con respecto a la presencia de múltiples variantes genotípicas (Tan et al., 2015; Khalifa et al., 2016; Parkin et al., 2020). En este trabajo se secuenciaron muestras por medio de la tecnología de NGS de Illumina MiSeq, las cuales se utilizaron para estudiar e identificar los genotipos circulantes

en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay correspondientes a las ciudades de Bella Unión, Salto y Fray Bentos mediante un análisis de epidemiología basada en las aguas residuales y la inferencia de diferentes árboles filogenéticos para cada virus estudiado. En el caso de los árboles filogenéticos contruidos para NoV GII y AstV, se incluyeron también estirpes virales secuenciadas por la metodología de Sanger para así complementar el análisis de la diversidad genotípica de estos virus en nuestro trabajo. De manera general, se logró identificar las diferentes variantes genotípicas de estos virus que circulaban en el período analizado en las poblaciones ribereñas del Río Uruguay, encontrando una mayor diversidad de genotipos principalmente para NoV y HAstV.

En el caso de RVA, en el análisis filogenético se observaron los genotipos G3 y P8 para la secuenciación por NGS que si lo comparamos con un trabajo publicado anteriormente por nuestro grupo realizado por la metodología de Sanger (Bortagaray et al., 2023), están alineados con lo observado en el presente estudio por NGS donde se observaron los mismos genotipos. Este resultado es interesante ya que a priori esperábamos obtener una mayor presencia de diferentes genotipos por medio de la secuenciación por NGS en comparación con el análisis por Sanger de las mismas muestras. Esto podría deberse a que las poblaciones analizadas son pequeñas en comparación con las incluidas en otros estudios, donde el mayor tamaño poblacional incrementa considerablemente la probabilidad de detectar la circulación de múltiples genotipos (Du et al., 2021). En comunidades de menor tamaño, es más probable identificar un único genotipo circulante, ya que este virus suele originar brotes de gastroenteritis causados por un mismo genotipo, y además el muestreo fue puntual y no se utilizaron muestras compuestas. En el caso del RVA, su mayor frecuencia de circulación se observa en niños pequeños, quienes no eliminan directamente sus excretas en el sistema de saneamiento debido al uso de pañales, lo que podría explicar la ausencia en las aguas residuales de los genotipos predominantes en este grupo etario.

En el caso de VP4, nuestras muestras agruparon con secuencias de referencias que corresponden a muestras clínicas de Argentina en un trabajo publicado en el 2009 y en Japón en el 2016 donde se detectó de forma inusual dicho genotipo. Esto evidencia cómo la circulación de estos virus entéricos se caracteriza por

una rápida diseminación espacial y temporal, lo que resulta en la presencia de una misma estirpe viral en regiones geográficamente muy distantes. (Mandile et al., 2014; Komoto et al., 2018).

El G-tipo encontrado agrupó con cepas de origen canino, sin embargo, no se detectaron cepas de origen humano. Este resultado contrasta con lo observado en Jinan, China donde se identificó un total de 9 genotipos G y 13 genotipos P de rotavirus, y el análisis filogenético reveló que los genotipos dominantes, G9 y P[8], estaban estrechamente relacionados con secuencias de rotavirus previamente identificadas en humanos, sugiriendo un posible origen antropogénico para estos virus en las aguas residuales (Du et al., 2021). Según se ha observado en diversos trabajos, el genotipo G3 posee el espectro de hospedadores más amplio identificado hasta ahora. Se han aislado cepas G3 en una gran variedad de especies, incluyendo humanos, primates no humanos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, así como en perros, gatos, conejos y ratones (Wen et al., 1997; El-Attar et al., 2002; Varshney et al., 2002; Lee et al., 2003; Estes y Kapikian, 2007), lo que nos lleva a sugerir que el genotipo encontrado en nuestro trabajo al agrupar con una cepa canina podría estar evidenciando animales domésticos excretando el virus que al estar en el domicilio de las personas, podría generar un salto inter especie.

Para NoV GII se observó una gran variabilidad genotípica en el secuenciado por NGS. Para NGS se encontraron dos genotipos diferentes (GII.2 y GII.4) circulando en las aguas residuales estudiadas que no se habían evidenciado en la secuenciación por Sanger. Este resultado contrasta con un estudio realizado en África, donde se identificaron, mediante NGS en aguas residuales, los siguientes genotipos: GII.2, GII.9, GII.4, GII.6, GII.17, GII.3, GII.12, GII.7, GII.1, GII.8, GII.10, GII.13 y GII.16 (Mabasa et al., 2022).

Por otro lado, cuando analizamos el árbol filogenético correspondiente a AstV, se observa variabilidad genotípica en las muestras secuenciadas por NGS. Cabe destacar que la muestra AstV otoño está compuesta por 2 colectas diferentes, mientras que AstV i-p-v contiene 7 muestras generando 10 centroides, una menor cantidad respecto a AstV otoño en el cual se generaron 14. En lo que se refiere a trabajos basados en vigilancia a través de aguas residuales por NGS, en la región no hay datos publicados.

Es de destacar, que se amplificaron y purificaron secuencias para NoV GI, las cuales fueron enviadas a MacroGen para ser secuenciadas, pero no pasaron los filtros de calidad a las cuales son sometidas previo a la secuenciación por lo que decidimos no secuenciarlas. Cabe destacar también que, tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica, no se encontraron estudios que abordaran simultáneamente los tres virus analizados en este trabajo utilizando muestras de aguas residuales.

Se evidenció la co-circulación de distintas estirpes virales, tanto de origen humano como canino, de los tres virus gastroentéricos analizados en aguas residuales provenientes de la población de tres ciudades ribereñas del río Uruguay. Para ello se empleó la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS), lo que demuestra la utilidad del enfoque de la Epidemiología Basada en las Aguas Residuales (WBE) para el estudio de estas virosis, especialmente en países en desarrollo donde los recursos destinados a la vigilancia epidemiológica son limitados.

Luego de haber realizado este trabajo, que constituyó el primero en Uruguay en cuanto a la caracterización molecular mediante NGS en aguas residuales, nos planteamos como perspectiva a futuro ampliar el estudio a otras ciudades del país. Consideramos que la expansión a diferentes regiones y períodos temporales, como pueden ser pooles por estaciones del año o 2 períodos como pueden ser meses calurosos y fríos, permitiría evaluar si los patrones observados se mantienen en distintos contextos geográficos y temporales. Incorporar esta línea de investigación futura no solo enriquecería el alcance del estudio, sino que también fortalecería la comprensión de la dinámica de los agentes analizados en las aguas residuales a nivel nacional ayudando a entender la epidemiología de dichos virus y como alerta sanitaria ante la eventual aparición de algún genotipo nuevo que pueda ocasionar brotes, epidemias o enfermedades graves.

Capítulo III: “Comparación del riesgo de infección por rotavirus y astrovirus humano para actividades recreativas de nado y pesca en el Río Uruguay”

Objetivo: Realizar la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico de infección de estos virus gastroentéricos por bañistas en el balneario Las Cañas y pescadores en la ciudad de Fray Bentos.

Resumen

Los virus gastroentéricos persisten en el ambiente siendo una constante amenaza para las poblaciones expuestas a ellos por diferentes medios como puede ser el acuático, debido a diversas actividades recreativas tales como natación o pesca, entre otras. El objetivo del presente estudio fue realizar un análisis de riesgo cuantitativo (QMRA) para RVA y HAsV y determinar el riesgo de infección existente por dichos virus al usar las aguas del río Uruguay con fines recreativos tanto de nado como de pesca. Se colectaron muestras mensuales de agua superficial (10 Litros), durante un año en el balneario Las Cañas (actividad de nado) y en Fray Bentos (actividad de pesca), Uruguay. En el QMRA se utilizaron los modelos dosis-respuesta β Poisson y 1F1 hipergeométrico para RVA y HAsV, respectivamente. Se calcularon las probabilidades de infección utilizando una estimación por densidad de núcleos para ajustar los datos y luego a partir de esta distribución se realizó una simulación de Monte Carlo para los datos. La probabilidad de infección por RVA para los pescadores variaron entre 0% y 65% y para nadadores entre 0% y 50% para personas menores de 18 años de edad y entre 0% y 38% para personas mayores de 18 años de edad. En el caso de HAsV, la probabilidad de infección para los pescadores estuvo comprendida entre 0% y 45% y para los nadadores esta probabilidad varió entre 0% y 38% para personas menores de 18 años de edad y entre 0% y 18% para mayores de 18 años. Este estudio sugiere que los pescadores tienen un mayor riesgo de infección por ambos virus en comparación con los nadadores. También destaca los diferentes riesgos de infección por rotavirus y astrovirus, para dos actividades populares en nuestro país como lo son la natación y la pesca, evidenciando su posible impacto negativo en la salud pública cuando dichas aguas contaminadas son utilizadas con estos fines recreativos.

Nota: Paralelamente a este trabajo, con el Ingeniero Tecnológico Electrónico y Analista Programador Marcos Grilli se creó un programa informático (software) amigable capaz de realizar el Análisis de Riesgo para virus gastroentéricos detectados en aguas de recreación. El software pretende recoger diversas necesidades de cálculo, análisis y procesamiento de datos en el ámbito de la investigación. En este sentido su utilización no requiere entrenamiento ni conocimientos previos de programación ni de cálculo, logrando así liberar recursos temporales al usuario. Se implementaron interfaces de fácil acceso y manipulación, delegando las tareas de validación y consistencia al software. Se utilizó el idioma inglés para su interfaz, salvo para aquellos cuadros de diálogo que se basan en el idioma del sistema operativo. El mismo se desarrolló en Java 8, utilizando librerías libres tales como JFreeChart o apache.org. Se utilizaron patrones de diseño tales como: Strategy, Factory, Singleton y Observer. El software está abierto a la extensión, no requiere instalación para su ejecución y es multiplataforma. Dicho programa se encuentra disponible para ser utilizado por quien lo solicite.

Comparison of the risk of infection of human rotavirus and astrovirus according to fishing and swimming activities at Las Cañas beach, Uruguay

Bortagaray Viviana¹ | Gamazo Pablo² | Castro Sebastián³ | Grilli Marcos¹ | Colina Rodney¹ | Victoria Matias¹ 

¹Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay

²Department of Water, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay

³Department of Mathematics and Estadistic from litoral (DMEL), CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay

Correspondence

Victoria Matias, Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Uruguay, Calle Rivera 1350, Salto 50000, Uruguay.
Email: matvicmon@yahoo.com

Funding information

National Agency of Research and Innovation (ANII), Grant/Award Number: FCE_1_2017_1_136092

Abstract

Aims: To estimate the risk of human rotavirus (RV) and astrovirus (HAstV) infections for swimmers and fishers at Las Cañas beach, Uruguay.

Methods and Results: Surface water samples were collected monthly for 1 year. The dose–response models used were β -Poisson and $1F_1$ hypergeometric for RV and HAstV, respectively. The probabilities of infection were calculated using a kernel density estimate to fitting the data and then sampling from this distribution (Monte Carlo simulation). The probability of RV infection for fishers was between 0 and 65% and for swimmers was between 0 and 50% (<18 years old) and between 0 and 38% (>18 years old). For HAstV, the probability of infection for fishers was between 0% and 45% and for swimmers was between 0 and 38% (<18 years old) and between 0 and 18% (>18 years old).

Conclusions: This study suggests that fishers are at higher risk of infection for both viruses compared with swimmers mainly due to higher viral frequency and concentration at the site for fishing activities.

KEYWORDS

astrovirus, fishers, QMRA, rotavirus, surface water, swimmers

INTRODUCTION

Viruses can survive in the environment for long periods of time, longer than most intestinal bacteria. Enteric viruses survive for more than 70 days at 20°C in drinking and surface water. Free nucleic acids (i.e., without capsid) persist for at least 16 days in these matrices (Prevost et al., 2016). Moreover, genomic RNA from the Hepatitis A virus has been observed to persist for up to 90 days in water (Trudel-Ferland et al., 2021). Enteric viruses are the most common and dangerous waterborne pathogens, causing both sporadic- and outbreak-related illnesses (La Rosa et al., 2012). They are highly stable in the environment because they

lack the lipid envelope, being able to persist for a long time in the water. Despite the relatively low concentration of viruses in faecal-impacted water, their presence carries health risks since they have very low infectious doses (10–100 virions) and therefore even a few viral particles in water can infect a person (La Rosa et al., 2012). These viruses cause several types of diseases such as diarrhoea which is the second/third leading cause of death for children under 5 years old mainly in developing countries. More than 700 million estimated cases of acute gastroenteritis occur annually in children under 5 years old, resulting in few deaths in developed countries, but more than 3 million deaths in developing countries (Kotloff, 2017).

Rotaviruses are nonenveloped viruses with a dsRNA-segmented genome. The majority of human and mammalian infections, due to group A viruses, are further classified into genotypes by genetic differences in VP7 (G-genotypes) and VP4 (P-genotypes) genes. However, rotavirus strains with gene segments of feline, bovine or porcine origin have been isolated from children, suggesting the occurrence of cross-species infection in nature (Bishop & Kirkwood, 2014). Yearly winter epidemics of rotavirus disease are regularly observed in countries with temperate climates, whereas rotavirus disease is prevalent year-round in tropical climates lacking defined winter seasons (Bishop & Kirkwood, 2014; Esona & Gautam, 2015). Children worldwide will experience at least one rotavirus infection by 5 years of age (Bishop & Kirkwood, 2014). Symptoms of primary infection require medical attention in 1:5 children, resulting in hospitalization in 1:65 children and death in 1:293 (almost all in young children in developing countries) (Bishop & Kirkwood, 2014). The incidence of rotavirus is estimated to be 10,000 cases per 100,000 in children below 5 years in Bangladesh (Pecenka et al., 2017). In Argentina, it was responsible for over 200,000 acute diarrhoea cases and from 30 to 50 deaths annually in children under 5 years in the prevaccination era (Degiuseppe & Reale, 2017). In this country, the vaccination coverage in 2017 was 61%–75% when a drop of 50% in cases of acute diarrhoea caused by rotavirus was observed (Areso et al., 2018).

Unfortunately, in our country, we do not have surveillance for both rotavirus and human astrovirus in order to provide information on its national incidence. Only research studies have been performed in order to determine information concerning the epidemiology of these viruses in specific settings (Berois et al., 2003; Lopez et al., 2017; Tort et al., 2015). Moreover, in our country, RV vaccination is not included in the national vaccination schedule (not mandatory) then, and there is no information concerning RV vaccine coverage and the proportion of immunized population.

Astroviruses are nonenveloped, positive-sense single-stranded RNA viruses that cause gastrointestinal illness being one of the leading causes of paediatric diarrhoea (Cortez et al., 2017). Human astroviruses (HAsVs) are one of the major viral agents of acute gastroenteritis in all age groups, especially in young children (Dai et al., 2010). They have been detected in humans (children and adults) sheep, cattle, pigs, dogs, cats, mice and some avians usually associated with diarrhoea. Prevalence rates as a cause of diarrhoea vary from 2% to 16% (hospital-based studies), and from 5% to 17% (community-based studies). Most astrovirus infections have been recorded during colder months in temperate climates and year-round in tropical countries (Bishop & Kirkwood, 2014). Astroviruses are widespread in developed countries, causing outbreaks in daycare centres, hospitals, and nursing homes for the elderly. They are an

important cause of enteritis in immunocompromised patients. Acute astrovirus infection induces mild watery diarrhoea in young children that lasts for 2–3 days and may be associated with vomiting, fever and anorexia (Bishop & Kirkwood, 2014). Epidemiological studies have shown that between 2% and 5% of swimmers become ill after exposure to bathing in beach water (Cabelli et al., 1979; Dufour, 1984; Dufour et al., 2017; Wade et al., 2006, 2008, 2010). In Nigeria, a study shows that HAsV contributes substantially to the burden of gastroenteritis and is detected in all age groups between 0 and 5 years, with the highest prevalence in 0- to 12-month-old children (Arowolo et al., 2020). Astroviruses are estimated to account for 2%–9% of children presenting with diarrhoea in ambulatory-, clinical- or hospital-based settings worldwide and 4%–5% of diarrhoeal disease in community settings in Egypt and Mexico (Olortegui et al., 2018). Astroviruses cause both endemic infections and food-borne outbreaks (Desselberger, 2017).

One of the challenges of monitoring viruses in recreational waters is their low and variable concentrations, often resulting in observations below the detection limit (BDL) of the viral methodology. To evaluate the risk of infection or illness due to exposure to water with low concentrations of enteric viruses and other pathogens, a set of statistical tools known as Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA) has been developed (Haas et al., 1993). QMRA has been applied to water contaminated with bacteria (Abia et al., 2016), viruses (Prez et al., 2015) and parasites (Krkosek et al., 2016) and the risk calculated has been used to make decisions regarding public health. QMRA involves four stages such as hazard identification, exposure assessment, dose–response assessment and risk characterization (Poma et al., 2019).

The risk characterization is either deterministic (single values such as means are used to describe the variables used in the QMRA model) or probabilistic (statistical distributions are used to describe variables used in the QMRA model). In a deterministic QMRA, estimates of each of the QMRA model variables in the exposure and effects assessment are selected and combined to compute the resulting health risk. In a probabilistic QMRA, statistical distributions are used to describe the model variables, which reflect the stochastic (variable/uncertain) nature of most of the model variables more appropriately. The type of distribution selected considers a combination of knowledge of pathogens in water systems. The health risk is computed by combining the statistical distributions, using Monte Carlo methods and dose–response models (Haas et al., 2014b). There is a wide range of software tools available to support these calculations. Dedicated QMRA models and software tools are increasingly available to aid this risk characterization step (Bassett Jr et al., 2012). The need to conduct

a deterministic, screening-level QMRA or a probabilistic, in-depth QMRA, is primarily determined by what is needed to determine the best risk mitigation options (WHO, 2007). QMRA has to work frequently with assumptions and the use of default assumptions is well recognized in risk assessment. When data are absent and assumptions are used, the tendency is to use conservative or worst-case scenarios (estimates), to 'be on the safe side' (WHO, 2007).

The aim of this study was to estimate and compare the risk of RV and HAsTV infections in two different activities such as swimming and fishing in surface water at Las Cañas beach, Uruguay.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of surface water

The Uruguay river basin has an extension of 340,000 km² through the countries of Brazil, Argentina and Uruguay. Its flow is 4,500 m³/s, two times higher compared to that of the Nile River. Its population is 975,000 inhabitants among the three countries mentioned above (CARU, 2022).

From May 2018 to April 2019, monthly collections were performed in a site called Frigorífico del Anglo (FA), 1 km

downstream from Fray Bentos city (24,406 inhabitants) and in Las Cañas beach (LC), both on the shores of the Uruguay River ($n = 24$) (Figure 1). LC is located 7.4 km downstream from Fray Bentos city (INE, 2011). Each sample consisted of 10 L of surface water collected in a sterile bottle and immediately transferred to the laboratory at 4°C. The site FA is visited by fishers all over the year, while the site LC is mainly used in the spring (September to December) and summer (December to March) seasons.

FA is a sampling site characterized by the high presence of fishers because wastewater from Fray Bentos is dumped at this site, which generates an accumulation of fish. LC is one of the most important freshwater beaches in Uruguay, characterized by its large camping area, hotels and restaurants. During summertime, people from many cities come to LC to spend their holidays, since, in addition to a large suitable area for bathing, other water activities can be carried out, such as canoeing.

Viral concentration and nucleic acid extraction

The concentration of viral particles was performed by skimmed milk flocculation (Calgua et al., 2013). Briefly, a preflocculated 1% (w/v) skimmed milk solution (PSM)



FIGURE 1 Maps showing the sites of surface water collection. Frigorífico del Anglo (FA) for fishing activities and Las Cañas (LC) for swimming activities.

was prepared, the sample was carefully acidified to pH 3.5 by adding HCl 1 N and the PSM was added. Samples were stirred for 8 h at room temperature and flocs were allowed to form sediment by gravity for another 8 h. The supernatant was carefully removed and a final volume of about 500 ml containing the sediment was transferred to a centrifuge tube at 7,000 $\times g$ for 30 min at 12°C. The supernatant was carefully removed and the pellet dissolved in 10 ml of phosphate buffer (1:2, v/v of Na₂HPO₄ 0.2 M and NaH₂PO₄ 0.2 M) at pH 7.5. The viral concentrate was stored at -80°C.

Viral RNA was extracted from 140 μ l of the concentrated sample using the commercial QIAamp Viral RNA kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). The manufacturer's protocol was followed, and the purified viral RNA was eluted in 30 μ l of elution buffer and stored at -80°C until the reverse transcription (RT) procedure. Extracted RNA was reverse transcribed into cDNA using the SuperScript II Reverse Transcriptase and Random Hexamer Primers (both from Invitrogen™), according to the manufacturer's instructions. Ten microlitres of RNA and a 10-fold dilution of RNA were used as a template for RT in order to remove enzymatic inhibitors.

Quantitative PCR (qPCR)

qPCR was performed with TaqMan technology and Rotor-Gene Q instrument (Qiagen®); undiluted and 10-fold diluted samples were analysed in duplicate. In order to quantify RV, a standard curve was generated by using 10-fold dilutions (10^7 – 10^0 genome copies reaction⁻¹) of a plasmid containing an amplicon of 86 bp described by Zeng et al. (2008). For HAsTV quantification, a standard curve was generated by using 10-fold dilutions (10^8 – 10^0 genome copies reaction⁻¹) of a plasmid containing an amplicon of 76 bp described by Dai et al. (2010).

Five microlitres of cDNA were used as a template with SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline®) together with primers and probes described by Zeng et al. (2008) for RV and by Dai et al. (2010) for HAsTV (Table 1).

Quantitative microbial risk assessment (QMRA)

A four-step QMRA was applied in this study as follows: (i) hazard identification, (ii) exposure assessment, (iii) dose-response assessment and (iv) risk characterization (Toze et al., 2010; USEPA/USDA/FSIS, 2012; WHO, 2001). Concentration data obtained by qPCR for RV and HAsTV were used to perform the QMRA. The workflow of this assessment is depicted in Figure S1.

Hazard identification

The hazards identified in this study were RV and HAsTV which present a faecal-oral route of transmission. RV has been shown to cause 40%–50% of severe acute diarrhoea in young children worldwide in both developing and developed countries in prevaccination era (Mukherjee & Chawla-Sarkar, 2011). HAsTV plays an important role in infectious diarrhoea among all age groups. Most individuals (90%) will have developed antibodies towards astrovirus by the age of 9 years old, underscoring its prevalence. Gastrointestinal illnesses are recognized as potential human health hazards due to their status as one of the leading causes of human morbidity and mortality worldwide by the World Health Organization (WHO, 2011).

Exposure assessment

The dose or pathogen number involved in the exposure was calculated as follows:

$$d = C \times V_{wi}$$

$$V_{wi} = IR \times t_e$$

where d (genomic copies [gc]) is the dose ingested, C (gc ml⁻¹) is the concentration or density of pathogens,

TABLE 1 Nucleotide sequences of primers and probes designed for qPCR assays performed in this study for human astrovirus (HAsTV) and rotavirus (RV)

Primer/probe	Sequence (5'→3')	Position in the genome ^a	Reference
HAsTVF	CCDGCCAGRCTCACAGAAGAG	4264–4284	Dai et al., 2010
HAsTVR	GACTTGCTAGCCATCACACTYC	4318–4339	Dai et al., 2010
Probe	FAM–ACTCCATCGCAITTTGGAGGGGAGGACC–TAMRA	4287–4314	Dai et al., 2010
NSP3 f	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	963–988	Zeng et al., 2008
NSP3 r	GGTCACATAACGCCCTATAGC	1028–1049	Zeng et al., 2008
NSP3 probe	FAM–AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA–MGB	995–1017	Zeng et al., 2008

^aThe reference genome for HAsTV position was GenBank accession number L13745 and for RV was X81436.

V_{wi} (ml) is the volume of water ingested, IR (mlh^{-1}) is the ingestion rate and t_e (h) is the duration of the exposure.

IR was considered to have a uniform distribution between 0 and $154mlh^{-1}$ for children (<18years old) and between 0 and $53mlh^{-1}$ for adults (>18years old) that involved primary contact (swimming). Two different scenarios were used to calculate the ingestion rate (IR), one involved primary contact (swimming) for adults and children, and the other involved secondary contact, due to hand-mouth contact during fishing (Dufour et al., 2006; Poma et al., 2019).

The IR due to wet hand-to-mouth contact (Q_{HM} , in mlh^{-1}) was calculated (de Man et al., 2014) as follows:

$$Q_{HM} = H \times A \times f_{HM}$$

where H (cm) represents the film thickness of water on hands, A (cm^2) is the skin-surface area of the hand that touched the mouth and f_{HM} (number h^{-1}) is the frequency of hand-to-mouth contact (Poma et al., 2019).

For the simulations, H and A were considered to have a uniform distribution between 0.00197 and 0.00234 and between 1 and 20, respectively. For f_{HM} , a Gamma distribution was considered, with the shape parameter equal to 2 and the scale parameter equal to 0.5 (Poma et al., 2019). For both FA and LC, we fitted distributions of virus concentration data using Gaussian Kernels and estimated the smoothing parameter by 'Silverman rule' (Silverman, 1986).

The next step consists of the simulation from the fitted distributions. As we are dealing with mixtures, where the components are Gaussians centred in each observation and with standard deviation 'h', the procedure is the usual (1) simulate at random the component (with equal probability) and (2) simulate from this component (a Gaussian distribution). In this way, we can get a simulated sample of concentration levels, based on data and the fitted distribution by Kernels, so big as desired (100,000 in our case) and with this characterize the probability of infection associated with each site as well as its uncertainty.

One of the challenges of monitoring viruses in recreational water is the observation of BDL (Poma et al., 2019). To evaluate the risk of exposure when the data are composed of samples with detected and nondetected results, we considered three alternative strategies (A I, A II, A III) for the treatment of the zero values (censored values) obtained from the simulation: (1) transforming them to zeros, (2) replace them by half the detection limit and (3) replace them by simulated values from a uniform distribution between zero and the detection limit.

Strategy (1) is usual by default and presents the problem of possible underestimation of final risks. Strategies (2) and (3) are similar (both replace, in mean, by half the detection limit) but the last represents better the variability

expected in data. Then, using these three scenarios for the final generation of simulated levels of concentration, we calculated the respective doses and finally the infection probabilities or risks associated.

Dose-response models

We considered pathogen-specific dose-response models to estimate the probability of infection (Haas et al., 2014a; Mena et al., 2003). The dose-response models used were the β -Poisson model for RV infections ($\alpha = 0.2531$ and $N_{50} = 617$) and the $_1F_1$ hypergeometric for HAsTV (Haas et al., 2014a; Poma et al., 2019).

Risk characterization

The risk was calculated with R studio as Individual's Infection Risk (IIR) for each virus, and it was characterized as the total probability of infection (PI), after one exposure to recreational water through accidental ingestion (swimming activity) or secondary contact (fishing activity). A Monte Carlo simulation of 100,000 exposure events was conducted for characterization of uncertainty in the estimation of risk.

RESULTS

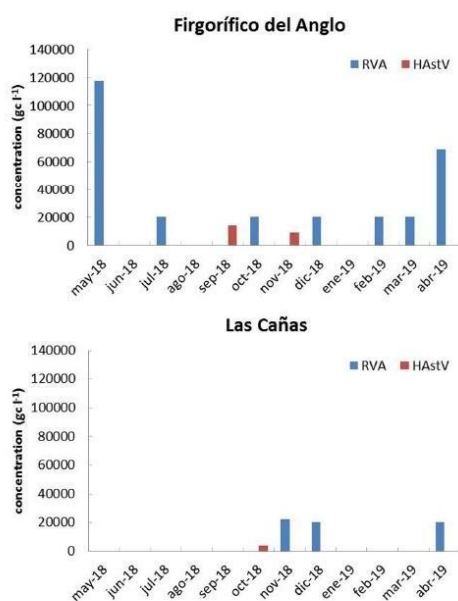
A total of 24 samples were analysed (12 from FA and 12 from LC) and 41.7% were positive for RV and 12.5% were positive for HAsTV. In the FA site, the detection of RV was 58.3% and for HAsTV, it was 16.7% of all the analysed samples. In LC, RV was detected in 25% and HAsTV in 8.3% of the analysed samples. The zero values of the qPCR were classified as not detected since these samples are BDL, which are $2030gcL^{-1}$ for RV and $406gcL^{-1}$ for HAsTV (Table 2).

At the sampling site known as FA, RV and HAsTV were detected both in colder (4months) and warmer (3 months) periods of the year. On the other hand, in LC, RV and HAsTV were detected in warmer months (October–December) and only in one colder month (April). For both collection sites, RV concentrations were always higher than the HAsTV concentration (Table 2 and Figure 2).

In Figure 3, we can observe the risk of infection for RV showing the three different alternatives (AI, AII and AIII) used to treat the BDL or zero values by qPCR. The probability of infection at the sampling site FA, which is characterized by the presence of fishermen, follows a distribution with values between 0 and 0.7, that is the probability of infection for the fishermen in this place was between 0% and 70%. At the sampling site LC, used for swimming activities, the probability of infection by RV for

TABLE 2 Frequency and quantification of rotavirus (RV) and human astrovirus (HAstV) in Frigorífico del Anglo (FA) and las Cañas (LC), Uruguay

Virus	Collection site	Frequency (positive/total)	Mean ^a	95% Confidence Interval ^a	Maximum–minimum ^a
RV	FA	58.3% (7/12)	2.4E+04	6.4 E+02	1.2E+05–2.0E+04
	LC	25.0% (3/12)	5.2E+03	1.7 E+02	2.2E+04–2.0E+04
	total	41.7% (10/24)	1.5E+04	6.1 E+02	1.2E+05–2.0E+04
HAstV	FA	16.7% (2/12)	1.9E+03	8.3 E+01	1.4E+04–8.9E+03
	LC	8.3% (1/12)	3.4E+02	2.1 E+01	4.1E+03–4.1E+03
	total	12.5% (3/24)	1.1E+03	7.4 E+01	1.4E+05–4.1E+03

^aExpressed as genomic copies litre⁻¹.**FIGURE 2** Distribution of the concentration of rotavirus and human astrovirus according to the date and the collection site.

swimmers older than 18 years old was between 0 and 0.35 and for swimmers under 18 years old presents a distribution between 0 and 0.45 (Figure 3).

The probability of infection for HAstV at the sampling site FA for fishers has a distribution between 0 and 0.45, for the three different alternatives (AI, AII, AIII) used to treat the BDL or zero values by qPCR. At the sampling site LC, used for recreational activities, the probability of infection by HAstV for swimmers older than 18 years old was between 0 and 0.18 and for people under 18 years old presents a distribution between 0 and 0.37 (Figure 4).

The 95% quantile of the distribution of the probability of infection for RV in FA was 45%, while for HAstV was 17%. In the case of the site LC, for swimmers under 18 years of age, the 95% distribution of the probability of infection by RV was 41%, while for HAstV was 11%. For swimmers older than 18 years at the same site, this 95% quantile for RVA was 27%, while for HAstV was 4%.

DISCUSSION

In this study, a QMRA approach was performed for RV and HAstV infections in order to compare the probability of infections between these enteric viruses for different recreational activities (swimming and fishing) and also different strategies were evaluated for the concentration values BDL. Some authors used zeros to represent nondetect results (Borchardt et al., 2012), while others replace them with a particular value such as the limit of detection (LOD) for the concentration/quantification methodology (Mara & Sleight, 2010; Rijal et al., 2011) and others used the sample limit of detection (SLOD). Moreover, the SLOD takes into account the efficiency of virus recovery during the concentration of water, the volumes and the efficiencies of molecular reactions in their process (Poma et al., 2019). It is important to note that in the analysed samples, zero values can either represent an absence of viruses or reflect a viral concentration below the detection limit of the assay. That is why it is common in the QMRA literature the consideration of zero values as 'censored values' and there are different suggested strategies for their analysis (Poma et al., 2019). Of a total of 24 samples for both RV and HAstV, 58% of the samples analysed for RV were BDL, while for HAstV, 88% of these were below this limit by the qPCR methodology. Based on these results, we consider three different alternatives

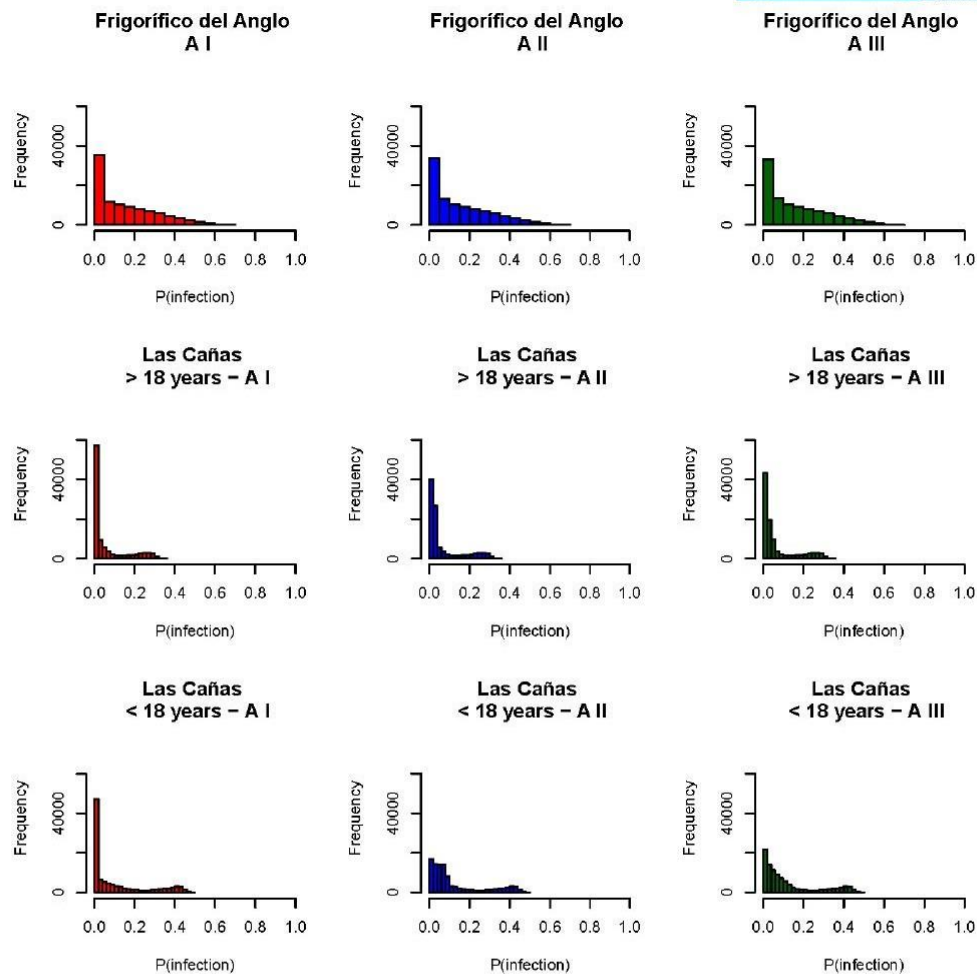


FIGURE 3 Risk of infection for rotavirus in Frigorífico del Anglo (FA) for fishing activities and in Las Cañas beach (LC) for swimming activities according to the age of the exposed person. The three alternatives analysed for values below the detection limit were transforming them to zeros (A I), replacing them by half the detection limit (A II) and replacing them with simulated values from a uniform distribution between zero and the detection limit (A III).

for the treatment of these zero values since they are the majority of the samples. The results obtained with these different alternatives show that the probabilities of infection for the three treatment alternatives for 'zero' values have similar results for both viruses along the risk distribution; therefore, we suggest that these values can be treated either as zeros or as BDL.

Considering the results above the BDL, RV was detected more frequently as well as in higher concentrations than HAsTV. For RV, the frequency of detection was higher in FA than LC; this could be explained since a wastewater pipe from Fray Bentos city is discharging into the river at

FA. Moreover, according to a study performed by Espinosa et al. (2008), RV is more stable than HAsTV in surface water, and RV concentrations were higher than HAsTV concentrations in a previous 1-year study performed in several cities in this region of Uruguay where several enteric viruses were quantified in wastewater samples that are the source of contamination for surface water (Victoria et al., 2014). Unfortunately, in the analysed region of the country, there is no epidemiological data concerning the infections of both viruses in its population. We did not perform experiments in order to calculate the recovery efficiency of the protocol used in this study. However, the

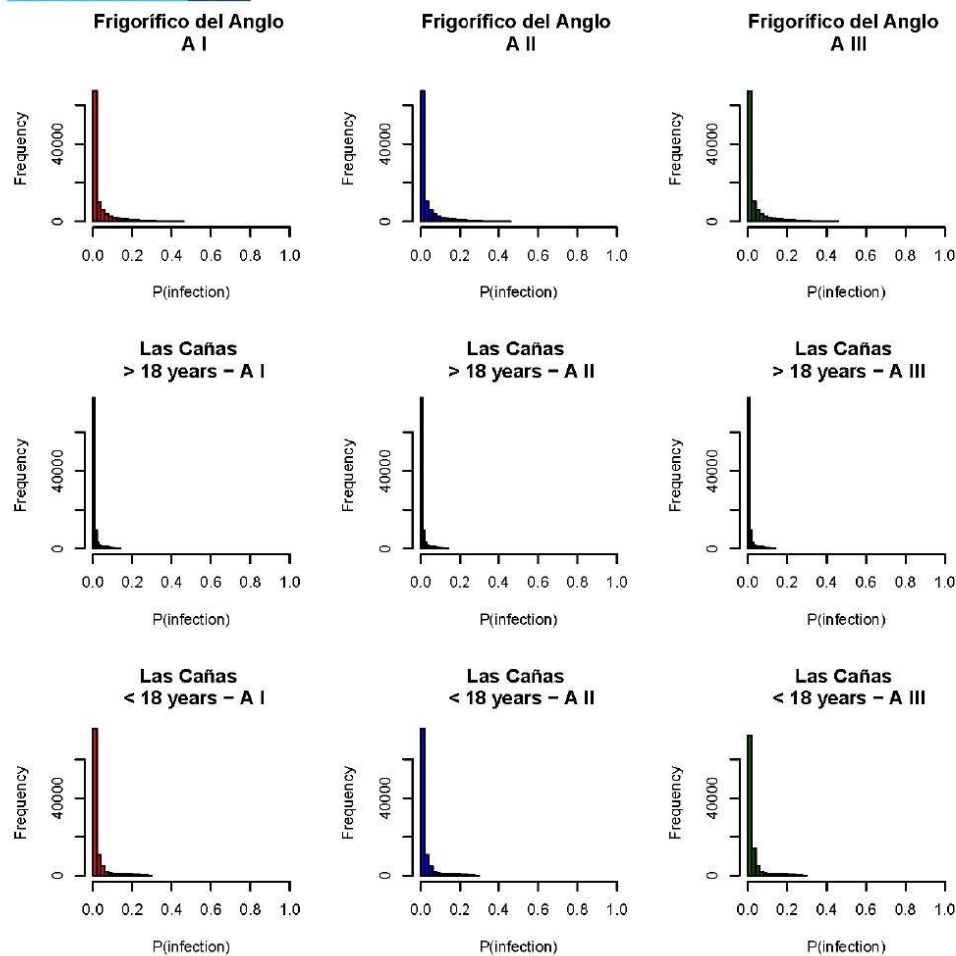


FIGURE 4 Risk of infection for human astrovirus in Frigorífico del Anglo (FA) for fishing activities and in Las Cañas beach (LC) for swimming activities according to the age of the exposed person. The three alternatives analysed for values below the detection limit were transforming them to zeros (A I), replacing them by half the detection limit (A II) and replacing them with simulated values from a uniform distribution between zero and the detection limit (A III).

recovery efficiency used in this study was determined by the authors that designed this viral concentration method and it has been used by several authors worldwide (Assis et al., 2018; Borgmästars et al., 2021; Calgua et al., 2013; Gonzales-Gustavson et al., 2017; Shubo et al., 2021).

The probability of infection for both RV and HAsTV was greater for those under 18 years of age compared to older 18, which shows (or 'is a consequence of') that these probabilities are directly related to the volume ingested during the swimming event since children under 18 years of age usually inadvertently ingest more water than adults when swimming or playing in the water (Dufour et al., 2006). It

is well known that immunity is an important key in order to the establishment of an infection, unfortunately, this parameter is not included in dose–response models (Hass et al., 2014).

Some studies show that greater health risk is associated with a primary contact, in which the body and head are submerged in water compared to secondary contact such as fishing and boating, where the volume of water ingested is lower (Dorevitch et al., 2012; Zhang et al., 2019); however, in our study, we observed that for fishers (or secondary contact), the risk of infection is higher than for swimmers for RV and HAsTV. This is likely explained since

high viral frequency and concentration were observed in the site used for fishing than swimming activities.

In our study, the probability of infection for swimmers was between 0 and 45% which is higher compared with results obtained from a study conducted in the Ruhr river that varied between 0.9% and 2.6% for viral gastroenteritis (rotavirus and norovirus enteritis, Giardiasis and Cryptosporidiosis) (Timm et al., 2016), but were similar to the probability of infection observed in a previous study conducted by our group in the Santa Lucia and Uruguay River in Uruguay which were 64% and 68%, respectively (Bortagaray et al., 2020). The probability of infection was calculated based on all the samples regardless of the season of the year which can add bias concerning the seasonality of enteric virus infections. Further studies taking into account the risk of infection specific for warmer months, where most people use this beach for swimming activities, will improve the uncertainties of the QMRA analysis on this scenario.

Difficulty in fitting a probabilistic distribution to our virus concentration data was that the pattern of observed data did not correspond with the distributions usually considered in the QMRA literature. This is mainly due to the multimodal pattern of the data, which could suggest the consideration of mixture distributions. One problem with this option is the data availability to fitting distributions with several parameters. However, one alternative that we considered was fitting by Kernel density estimates (Silverman, 1986). This tool can be seen as a mixture of distributions, one per observation, but with much fewer parameters to estimate (the smoothing parameter 'h'). The Kernel density estimator is a nonparametric method with greater sensitivity to rare events, this method works by centring a Gaussian distribution (called kernel) over each sample data point (Scott, 1992). The probability density function is estimated as the accumulation of all kernels. The use of such a data representation ensures that the resulting probability density function is sensitive to individual data points including those that represent rare events in the sample (Petterson et al., 2001).

QMRA is a tool that uses dose-response (DR) models for specific/reference pathogens and assessment of different exposure scenarios to estimate the human health risks (Haas et al., 2014b). In 2003, the QMRA was indicated by WHO as a valid methodology for recreational water risk management (WHO, 2003), and to date, some governments have already integrated QMRA into their guidelines, such as Australia, the United States and New Zealand (Federigi et al., 2019). We consider that QMRA could be used as a powerful tool in order to mitigate the impact of waterborne gastroenteritis diseases in our country.

Our data were fitted to a Kernel distribution, which allowed us to calculate the risk of infection in a probabilistic approach, bringing these results closer to what happens in nature and allowing us to predict the risk of infection with

greater accuracy. Moreover, three different alternatives were evaluated for the values BDL by qPCR showing that, at least with our data, the risk of infection is independent of how these BDL values are treated.

It was possible to determine for the first time in Uruguay the risk of infection by RV and HAsTV in a probabilistic manner for fishing and swimming activities for children and adults in Las Cañas beach, where the probability of infection for RV was higher than for HAsTV. There is a considerable risk of infection for people who use the waters of the Uruguay River for swimming or fishing purposes in the sites analysed for the enteric viruses studied, revealing the impact of waterborne transmission of viral gastroenteritis in Uruguay.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the financial support for this project by Fondo Clemente Estable (FCE_1_2017_1_136092) of the National Agency of Research and Innovation (ANII), Uruguay.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that they have no conflict of interest.

ORCID

Victoria Matias  <https://orcid.org/0000-0001-6101-6936>

REFERENCES

- Abia, A.L.K., Ubomba-Jaswa, E., Genthe, B. & Momba, M.N.B. (2016) Quantitative microbial risk assessment (QMRA) shows increased public health risk associated with exposure to river water under conditions of riverbed sediment resuspension. *Science of the Total Environment*, 566, 1143–1151.
- Areso, M.S., Pedernera, M.C., Juárez, M., Stupka, J., Degiuseppe, J. & Gentile, A. (2018) Impacto de la vacunación para Rotavirus: ¿cuál es el rol de los Calicivirus humanos. *Revista del Hospital de Niños de Buenos Aires*, 60, 90–95.
- Arowolo, K.O., Ayolabi, C.I., Adeleye, I.A., Lapinski, B., Santos, J.S. & Raboni, S.M. (2020) Molecular epidemiology of astrovirus in children with gastroenteritis in southwestern Nigeria. *Archives of Virology*, 165(11), 2461–2469. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04741-0>
- Assis, A.S.F., Fumian, T.M., Miagostovich, M.P., Drumond, B.P., da Rosa, E. & Silva, M.L. (2018) Adenovirus and rotavirus recovery from a treated effluent through an optimized skimmed-milk flocculation method. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(17), 17025–17032. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1873-x>
- Bassett, D.R., Jr., Rowlands, A. & Trost, S.G. (2012) Calibration and validation of wearable monitors. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(1 Suppl 1), S32–S38. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182399cf7>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jmv.10511>

- Bishop, R.F. & Kirkwood, C.D. (2014) Enteric Viruses. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02566-6>
- Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Kieke, B.A., Lambertini, E. & Loge, F.J. (2012) Viruses in nondisinfected drinking water from municipal wells and community incidence of acute gastrointestinal illness. *Environmental Health Perspectives*, 120(9), 1272–1279. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104499>
- Borgmästars, E., Persson, S., Hellmér, M., Simonsson, M. & Eriksson, R. (2021) Comparison of skimmed Milk and lanthanum flocculation for concentration of pathogenic viruses in water. *Food and Environmental Virology*, 13(3), 380–389. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09477-x>
- Bortagaray, V., Girardi, V., Pou, S., Lizasoain, A., Tort, L.F.L., Spilki, F.R. et al. (2020) Detection, quantification, and microbial risk assessment of group A rotavirus in Rivers from Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 12(2), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09416-x>
- Cabelli, V.J., Dufour, A.P., Levin, M.A., McCabe, L.J. & Haberman, P.W. (1979) Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. *American Journal of Public Health*, 69(7), 690–696.
- Calgua, B., Fumian, T., Rusñol, M., Rodríguez-Manzano, J., Mbayed, V.A., Bofil-Mas, S. et al. (2013) Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Research*, 47(8), 2797–2810. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.043>
- CARU, 2022. El Río Uruguay en cifras. <https://www.caru.org.uy/web/acerca-de/prueba-pagina/>
- Cortez, V., Meliopoulos, V.A., Karlsson, E.A., Hargest, V., Johnson, C. & Schultz-Cherry, S. (2017) Astrovirus biology and pathogenesis. *Annual Review of Virology*, 4(1), 327–348. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041742>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0664-6>
- de Man, H., Bouwknegt, M., van Heijnsbergen, E., Leenen, E.J., van Knapen, F. & de Roda Husman, A.M. (2014) Health risk assessment for splash parks that use rainwater as source water. *Water Research*, 1(54), 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.010>
- Degiusseppe, J.I., Reale, E.A., Stupka, J.A. & Argentine rotavirus surveillance Network. (2017) Rotavirus epidemiology and surveillance before vaccine introduction in Argentina, 2012–2014. *Journal of Medical Virology*, 89(3), 423–428. <https://doi.org/10.1002/jmv.24650>
- Desselberger, U. (2017) Viral gastroenteritis. *Medicine (Abingdon)*, 45(11), 690–694. [doi:10.1016/j.mpmed.2017.08.005](https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.08.005)
- Dorevitch, S., Dworkin, M.S., Deflorio, S.A., Janda, W.M., Wuellner, J. & Hershov, R.C. (2012) Enteric pathogens in stool samples of Chicago-area water recreators with new-onset gastrointestinal symptoms. *Water Research*, 46(16), 4961–4972. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.030>
- Dufour, A. (1984) *Health effects criteria for fresh recreational waters EPA-600-1-84-004*. Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- Dufour, A., Evans, O., Behymer, T. & Cantú, R. (2006) Water ingestion during swimming activities in a pool: a pilot study. *Journal of Water and Health*, 4(4), 425–430.
- Dufour, A.P., Behymer, T.D., Cantú, R., Magnuson, M. & Wymer, L.J. (2017) Ingestion of swimming pool water by recreational swimmers. *Journal of Water and Health*, 15(3), 429–437. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.255>
- Esona, M.D. & Gautam, R. (2015) Rotavirus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 363–391. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.012>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.018>
- Federigi, I., Verani, M., Donzelli, G., Cioni, L. & Carducci, A. (2019) The application of quantitative microbial risk assessment to natural recreational waters: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 144, 334–350. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.073>
- Gonzales-Gustavson, E., Cárdenas-Youngs, Y., Calvo, M., da Silva, M.F., Hundesa, A., Amorós, I. et al. (2017) Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa, 134, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.006> Erratum in: *Journal of Microbiological Methods* 2017; 142:96.
- Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C. & Regli, S. (1993) Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Analysis*, 13(5), 545–552.
- Haas, C.N., Rose, J.B. & Gerba, C.P. (2014a) *Quantitative microbial risk assessment*. New Jersey, NJ: John Wiley & Sons.
- Haas, C.N., Rose, J.B. & Gerba, C.P. (2014b) Quantitative microbial risk assessment. John Wiley and Sons. Kotloff KL. The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. *Pediatric Clinics*, 64, 799–814. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.006>
- INE, I. P. (2011) *Censos 2011-resultados provisionarios*. Montevideo, Uruguay: IP Instituto Nacional de Estadística.
- Kotloff, K.L. (2017) The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatric Clinics of North America*, 64(4), 799–814. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.006>
- Krkosek, W., Reed, V. & Gagnon, G.A. (2016) Assessing protozoan risks for surface drinking water supplies in Nova Scotia, Canada. *Journal of Water and Health*, 14(1), 155–166. <https://doi.org/10.2166/wh.2015.034>
- La Rosa, G., Fratini, M., Della Libera, S., Iaconelli, M. & Muscillo, M. (2012) Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 48(4), 397–406. <https://doi.org/10.4415/ANN.12.04.07>
- Lopez, F., Lizasoain, A., Victoria, M., Papalardo, C., Castro, S., Arreseiger, E. et al. (2017) Epidemiology and genetic diversity of classic human astrovirus among hospitalized children with acute gastroenteritis in Uruguay. *Journal of Medical Virology*, 89(10), 1775–1781. <https://doi.org/10.1002/jmv.24854>
- Mara, D. & Sleigh, A. (2010) Estimation of norovirus infection risks to consumers of wastewater-irrigated food crops eaten raw. *Journal of Water and Health*, 8(1), 39–43. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.140>
- Mena, K., Gerba, C.P., Haas, C.N. & Rose, J.B. (2003) Risk assessment of waterborne coxsackievirus. *Journal of American Water Works Association*, 95, 122–131.
- Mukherjee, A. & Chawla-Sarkar, M. (2011) Rotavirus infection: a perspective on epidemiology, genomic diversity and vaccine strategies. *Indian Journal of Virology*, 22(1), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s13337-011-0039-y>

- Olortegui, M.P., Rouhani, S., Yori, P.P., Salas, M.S., Trigoso, D.R., Mondal, D. et al. (2018) Astrovirus infection and diarrhea in 8 countries. *Pediatrics*, 141(1), e20171326. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-1326>
- Pecenka, C., Parashar, U., Tate, J.E., Khan, J.A., Groman, D., Chacko, S. et al. (2017) Impact and cost-effectiveness of rotavirus vaccination in Bangladesh. *Vaccine*, 35(32), 3982–3987. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.087>
- Peterson, S.R., Ashbolt, N.J. & Sharma, A. (2001) Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment. *Water Environment Research*, 73(6), 667–672. <https://doi.org/10.2175/106143001x143402>
- Poma, H.R., Kundu, A., Wuertz, S. & Rajal, V.B. (2019) Data fitting approach more critical than exposure scenarios and treatment of censored data for quantitative microbial risk assessment. *Water Research*, 1(154), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.041>
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L. & Wurtzer, S. (2016) Viral persistence in surface and drinking water: suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Research*, 91, 68–76.
- Prez, V.E., Gil, P.I., Temprana, C.F., Cuadrado, P.R., Martínez, L.C., Giordano, M.O. et al. (2015) Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Science of the Total Environment*, 15(538), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.041>
- Rijal, G., Tolson, J.K., Petropoulos, C., Granato, T.C., Glymph, A., Gerba, C. et al. (2011) Microbial risk assessment for recreational use of the Chicago area waterway system. *Journal of Water and Health*, 9(1), 169–186. <https://doi.org/10.2166/wh.2010.020>
- Scott, D.W. (1992) *Multivariate density estimation, theory, practice, and visualization*. New York: Wiley and Sons.
- Shubo, T., Maranhão, A., Ferreira, F.C., Fumian, T.M., Pimenta, M.M.A., do Rosário Vaz Morgado, C. et al. (2021) Virological characterization of roof-harvested rainwater of densely urbanized low-income region. *Food Environmental Virology*, 13(3), 412–420. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09484-y>
- Silverman, B.W. (1986) *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*. London: Chapman & Hall. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3324-9>
- Timm, C., Luther, S., Jurzik, L., Hamza, I.A. & Kistemann, T. (2016) Applying QMRA and DALY to assess health risks from river bathing. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(7 Pt B), 681–692. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.07.017>
- Tort, L.F., 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. <https://doi.org/10.1002/jmv.24123>
- Toze, S., Elise Bekele, E., Page, D., Sidhu, J. & Shackleton, M. (2010) Use of static quantitative microbial risk assessment to determine pathogen risks in an unconfined carbonate aquifer used for managed aquifer recharge. *Water Research*, 44, 1038–1049.
- Trudel-Ferland, M., Jubinville, E. & Jean, J. (2021) Persistence of hepatitis A virus RNA in water, on non-porous surfaces, and on blueberries. *Frontiers in Microbiology*, 4(12), 618352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.618352>
- U.S. Environmental Protection Agency and U.S. Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USEPA and USDA/FSIS). (2012). Microbial risk assessment guideline: pathogenic microorganisms with focus on food and water. EPA/100/J-12/001; USDA/FSIS/2012-001.
- Victoria, M., Fumian, T.M., Rocha, M.S., Dalmao, F., Leite, J.P., Girones, R. et al. (2014) Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 117(4), 1210–1218.
- Wade, T.J., Calderon, R.L., Brenner, K.P., Sams, E., Beach, M., Haugland, R. et al. (2008) High sensitivity of children to swimming-associated gastrointestinal illness: results using a rapid assay of recreational water quality. *Epidemiology*, 19, 375–383.
- Wade, T.J., Calderon, R.L., Sams, E., Beach, M., Brenner, K.P., Williams, A.H. et al. (2006) Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. *Environmental Health Perspectives*, 114, 24–28.
- Wade, T.J., Sams, E., Brenner, K.P., Haugland, R., Chern, E., Beach, M. et al. (2010) Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. *Environmental Health*, 9, 66. <http://www.ehjournal.net/content/9/1/66>
- WHO. (2003) Guidelines for safe recreational water environments. *Coastal and Fresh Waters*, 1, 1–219.
- WHO. 2007. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- World Health Organization (WHO). (2001) Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. In: Fewtrell, L. & Bartram, J. (Eds.) *Water quality guidelines, standards and health*. London: IWA Publishing.
- World Health Organization (WHO). (2011) *Guidelines for drinking-water quality*. Geneva: WHO Press, pp. 117–153.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.004>
- Zhang, Q., Gallard, J., Wu, B., Harwood, V.J., Sadowsky, M.J., Hamilton, K.A. et al. (2019) Synergy between quantitative microbial source tracking (qMST) and quantitative microbial risk assessment (QMRA): a review and prospectus. *Environment International*, 130, 104703. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.051>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Viviana, B., Pablo, G., Sebastián, C., Marcos, G., Rodney, C. & Matias, V. (2022) Comparison of the risk of infection of human rotavirus and astrovirus according to fishing and swimming activities at Las Cañas beach, Uruguay. *Journal of Applied Microbiology*, 00, 1–11. Available from: <https://doi.org/10.1111/jam.15785>

Sección VI- Discusión globalizadora

Caracterización molecular

En el presente trabajo, se realizó la caracterización molecular mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y Sanger de virus gastroentéricos a partir de diversas muestras de aguas residuales provenientes de las ciudades de Bella Unión, Salto y Fray Bentos. Estas localidades, todas ubicadas a orillas del río Uruguay, vierten sus aguas residuales —ya sean tratadas o no— a este curso de agua, el cual desempeña un rol fundamental en la región, siendo utilizado para diversas actividades recreativas como el baño y la pesca, así también como para el riego y el abastecimiento de agua para consumo humano. Además de la caracterización molecular, se realizó un análisis de riesgo microbiológico cuantitativo (QMRA) en el balneario Las Cañas (Fray Bentos) ubicado en aguas del río Uruguay con el objetivo de evaluar la probabilidad de infección asociada al uso de estas aguas, aportando una visión integral sobre la potencial exposición de la población a estos agentes.

Existen diversos trabajos a nivel mundial pero no tanto a nivel regional que tratan acerca de la caracterización molecular de dichos virus, siendo la mayoría de estos realizados en muestras clínicas. Uno de ellos establece que, entre el 2009 y 2018, en China se llevó a cabo una vigilancia nacional prospectiva donde participaron 152.792 pacientes con diarrea aguda, de todas las edades observándose que los rotavirus del grupo A y los norovirus son los dos principales patógenos virales detectados en los pacientes estudiados, seguidos por los adenovirus y astrovirus (Wang et al., 2021). En ese estudio, también se observaron diferencias entre adultos y niños en cuanto a la prevalencia de los patógenos observados. También notaron que cuando se tiene en cuenta solo a los niños, el patógeno viral de mayor detección es RVA, sin embargo, cuando se tiene en cuenta solo a los adultos el que predomina es norovirus. En nuestro trabajo el patógeno viral más frecuentemente detectado en las aguas residuales analizadas fue RVA, seguidos de HAstV, NoV GII y NoV GI. Esta prevalencia de detección puede deberse a que si tenemos en cuenta el análisis filogenético realizado en la secuenciación por NGS se observa que algunas de nuestras

cepas de RVA que fueron secuenciadas e identificadas podrían tener un origen canino lo que podría explicar esta alta detección ya que en nuestro país existe una gran población canina de alrededor de 1,9 millones de individuos, no así que se deba a una población infantil ya que la mayoría de los niños que se ven afectados por este virus usan pañales y sus excretas no llegan a las aguas residuales.

Los virus gastroentéricos se caracterizan por su notable persistencia en el ambiente, pudiendo permanecer activos durante períodos prolongados, incluso hasta 90 días. Esta resistencia ambiental contribuye a que las aguas residuales contaminadas con estos microorganismos sean volcadas en ríos, los cuales son utilizados por diversas poblaciones para actividades como la recreación, la pesca, el consumo de agua o el riego de cultivos. Esta situación favorece la continuidad del ciclo de transmisión de estos patógenos a través del agua contaminada (Prévost et al., 2016; Trudel-Ferland et al., 2021). Esto representa una amenaza constante para la salud pública, especialmente en comunidades que dependen directamente de estos cuerpos de agua. A pesar de que su concentración en el ambiente puede ser baja, se ha demostrado que basta con una pequeña cantidad de partículas virales para provocar infección en un huésped susceptible (La Rosa et al., 2012). Además, un estudio reciente evidenció que la detección y cuantificación del genoma del norovirus (NoV) se mantiene constante en el tiempo, incluso cuando se observa una reducción en la cantidad de virus viables (Shaffer et al., 2022). Esto implica que la presencia del genoma viral en el ambiente podría seguir representando un riesgo infeccioso sostenido en el tiempo para las personas expuestas.

En cuanto a la capacidad de persistencia en el ambiente, se ha comprobado que el norovirus presenta una resistencia significativamente mayor en comparación con otros virus entéricos como rotavirus y astrovirus. NoV es capaz de sobrevivir en condiciones extremas, como la exposición a luz ultravioleta y a valores extremos de pH. Aunque rotavirus y astrovirus también muestran una considerable resistencia —debido en parte a su estructura sin envoltura—, su persistencia en superficies es ligeramente menor (Zhang et al., 2021; Gamazo et al., 2020; Vassickova et al., 2010). Teniendo en cuenta esta mayor persistencia y capacidad

de resistencia de Norovirus es que hubiésemos esperado que fuese el de mayor frecuencia en nuestro trabajo, pero no fue así, ya que RVA fue el de mayor detección en todos los puntos muestreados, lo que se puede atribuir a que nuestra PCR a pesar de estar diseñada para detectar cepas humanas, detectó también cepas caninas.

Cuando observamos la frecuencia de detección por qPCR y lo relacionamos con los amplicones que se obtuvieron y se mandaron a secuenciar, para las diferentes estirpes virales se observa que el porcentaje de muestras detectadas por qPCR es superior al de la PCR cualitativa, por ejemplo para RVA se observa que el porcentaje de detección fue de un 50% es decir 18 de las 36 muestras analizadas fueron positivas para RVA, mientras que si observamos los amplicones obtenidos por PCR convencional que luego se secuenciaron, observamos que para RVA fue de un 11% es decir 4 muestras positivas de un total de 36. En este trabajo se puede observar que existe una mayor sensibilidad de detección en las muestras analizadas por qPCR respecto a la PCR en tiempo final, lo que concuerda con estudios realizados anteriormente (Balasingham et al., 2017; Xia et al., et al 2018). Numerosos estudios han revelado que los porcentajes de detección del virus mediante PCR en tiempo real son más altos que los estudios que utilizan PCR convencional como método de detección. (Ye et al., 2012; Kluge et al., 2014; Pang et al., 2021; Rashid et al., 2021; Kumthip et al., 2023). Las muestras que se lograron genotipar tanto por NGS como por Sanger están en un porcentaje menor que las detectadas por qPCR, como en el caso de un trabajo realizado por Rovida y colaboradores (2020) donde se detectó RVA por qPCR en 111 de un total de 122 muestras (91%), mientras que cuando se amplificaron estas muestras positivas por cPCR se lograron amplificar 108 de las 111 muestras, es decir un 97% de las muestras que dieron positivo por qPCR, o dicho de otra forma un 88% del total de las muestras. Debido a esta menor detección por PCR tiempo final y luego genotipificación es que se puede inferir que los genotipos detectados no son todos los que están circulando sino que se podría decir o sugerir que en la realidad existe la posibilidad de que podrían estar circulando otros genotipos diferentes que no se logran amplificar y por ende secuenciar ya que disminuye la sensibilidad en la cPCR respecto a la qPCR. Para el caso de los astrovirus, no se puede comparar los diferentes porcentajes

de detección respecto a las modalidades de PCRs ya que la qPCR aplicada en este estudio permite detectar astrovirus clásicos y la cPCR está dirigida para la detección de los astrovirus emergentes. En el caso de NoV GII, si comparamos los porcentajes de detección en ambas metodologías observamos que para qPCR es del 36% mientras que para cPCR es del 31%, por otro lado, si comparamos las muestras detectadas por ambas metodologías para NoV GI, se observaron 10 muestras positivas por cPCR y 9 positivas por qPCR. Es decir, que para NoV no se evidencia una marcada sensibilidad superior de la técnica de la qPCR respecto a la cPCR, por lo que podemos notar que para RVA la sensibilidad de la qPCR es mayor respecto a la cPCR, pero no podemos asegurarlo según los otros virus estudiados.

Como ya fue mencionado, en nuestro país, la vacuna contra el RVA no forma parte del calendario gratuito de vacunación. Actualmente, las vacunas más conocidas a nivel mundial y que se comercializan en el Uruguay son dos, la vacuna Rotarix® que contiene una cepa G1P[8] atenuada y que presenta protección cruzada frente a otros genotipos circulantes, como G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G8P[4] y G12P[6], y la RotaTeq® que es una vacuna pentavalente con virus reasortante que expresan G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5], G6P[8] (Bennet et al., 2020). En nuestro estudio se observó que los genotipos que predominantemente circularon en el período de análisis, en las aguas residuales de las ciudades del litoral uruguayo, fueron G3 y P8. Era esperable que el G1 de la Rotarix no estuviera en una alta frecuencia ya que como comentamos, la vacunación no es gratuita y por ende la cobertura vacunal es baja y probablemente también lo sean los niveles de excreción de este genotipo. Sin embargo, en países donde la vacunación es obligatoria es común detectar dichos genotipos vacunal en los sistemas de vigilancia ambiental, como por ejemplo en Tailandia en un estudio realizado por Kittigul y colaboradores (2021), el genotipo más frecuentemente detectado fue G1, seguido por G3, G9, G2 y G6, lo que denota la circulación de la cepa vacunal en el lugar estudiado. El monitoreo ambiental ha sido una herramienta útil para evaluar el impacto del programa de vacunación en la circulación de RVA en algunos países (Prado et al., 2014) donde además se lo ha relacionado con varios brotes de gastroenteritis transmitida por el agua (Prado et al., 2014). Por otro lado, la vacunación no tiene

la misma eficacia en todas las regiones del mundo, por ejemplo, en África y en Asia se ha visto una disminución de su eficacia, la cual esta atribuida a diferentes factores como la diversidad genética, la nutrición, el microbioma intestinal y los anticuerpos de la lactancia materna que pueden afectar el rendimiento de la vacuna. A pesar de esta baja eficacia de la vacuna en África y Asia, el impacto de la vacuna es mayor en estas áreas de bajos ingresos, debido a la mayor carga de la enfermedad en comparación con regiones de países desarrollados (Rota Council, 2016). La vigilancia molecular del rotavirus sigue siendo importante en la era post vacuna para monitorear los cambios en los patrones de transmisión, identificar cambios antigénicos inducidos por la vacuna y descubrir cepas potencialmente patógenas relacionadas con la vacuna. En un trabajo realizado en una ciudad de Canadá, donde se introdujo la vacunación contra rotavirus en su calendario en junio de 2015, se analizó una cohorte prospectiva de niños con gastroenteritis aguda reclutados entre diciembre 2015 y agosto de 2018. Se identificaron cambios dinámicos en la positividad del rotavirus y las tendencias del genotipo durante los períodos previos y posteriores a la introducción de la vacuna contra el rotavirus. Los genotipos G9P[8], G1P[8], G2P[4] y G12P[8] predominaron consecutivamente en cada temporada con tasas generales de incidencia de rotavirus más bajas en 2016 y 2017. En niños con infecciones por RVA, el G12P[8] fue el predominante (Zhuo et al., 2023). En nuestro país no existen muchos trabajos con respecto de la epidemiología molecular de RVA, uno de ellos realizado por Tort y colaboradores (2015) en aguas residuales de diferentes ciudades uruguayas, observó la circulación de las cepas G1, G2, G3, G12, P[4], P[8] y P[3] donde se pudieron detectar genotipos humanos emergentes y poco comunes que también fueron detectados en muestras clínicas de Salto por los mismos autores, demostrando que en las aguas residuales se pueden detectar las mismas estirpes que circulan en la población cubierta por la red de saneamiento (Tort et al., 2015b). Estos trabajos muestran la importancia de conocer las cepas circulantes en nuestro país para poder tomar medidas acerca de incluir dicha vacuna a nuestro calendario de vacunación, pudiendo así salvar vidas y evitar cuadros graves de deshidratación por las graves diarreas que causan. En poblaciones vacunadas contra rotavirus, NoV es ahora la causa más común de diarrea en niños (Nordgren & Svensson, 2019). Al igual que en nuestro trabajo, Rovida y colaboradores (2020) en un trabajo

realizado con 1450 pacientes atendidos en un hospital universitario de Italia, observaron que los genotipos predominantes de RVA , fueron G3 y P8, aunque también detectaron G1, G9, G12, G2 y G6 para VP7 y los genotipos P4 y P9 para VP4, revelando también un pico de infecciones por RVA en el período de invierno-primavera en 2016, 2017 y 2018, seguido de una rápida disminución de la frecuencia de casos durante el verano, evidenciando estacionalidad debido a que en invierno hay mayor confinamiento y por lo tanto infección entre personas. En otro estudio realizado en Chiang Mai, Tailandia, mediante secuenciación por Sanger, se detectó el genotipo G4P[8] de RVA, mostrando una limitada diversidad genotípica (Kumthip et al., 2023). En un trabajo realizado previamente por Victoria y colaboradores (2014), en las mismas ciudades ribereñas del río Uruguay que aquí se estudiaron, se detectaron los genotipos P[8], P[4] y G2. Este hallazgo, en lo que concierne a los P-tipos, coincide con lo observado en nuestro trabajo, donde tanto la secuenciación por Sanger como por NGS revelaron la misma diversidad genotípica para RVA de P8 aunque P4 no fue detectado revelando su ausencia en la región estudiada, sugiriendo que dicho genotipo ya no estaría circulando en las mencionadas ciudades. En cuanto a los G-tipos, se detectó a G3 indicando un reemplazo del genotipo G2 por G3, lo que muestra que las cepas circulantes no siempre son las mismas, y que diferentes cepas pueden aparecer y ser por ejemplo más virulenta lo que evidencia la importancia de la vigilancia epidemiológica y de poder conocer los genotipos que circulan entre las diferentes poblaciones a través del estudio de sus aguas residuales. En este trabajo se ve reflejada una reducción en el número de los genotipos a pesar de analizar muestras de aguas residuales, que representan grandes poblaciones, donde se esperaba encontrar una mayor diversidad genotípica, considerando la gran capacidad de NGS para detectar variantes tanto mayoritarias como minoritarias.

En cuanto a los norovirus del genogrupo II (NoV GII), se encontró una leve diferencia en la diversidad genotípica entre ambas técnicas. Contrario a las expectativas, los resultados de Sanger mostraron una mayor diversidad en comparación con NGS. Esto se debió probablemente a que las muestras secuenciadas por NGS no incluyeron todas las analizadas mediante Sanger. En las muestras analizadas por NGS, correspondientes a colectas de marzo, abril y

mayo de 2017 en Fray Bentos y Salto, se detectaron los genotipos GII.2 y GII.4 variante Sydney, sin poder, lamentablemente, discriminar su distribución temporal o geográfica ya que componen un pool que fue secuenciado como tal, al contrario de lo que logró describir Ennuschate y colaboradores (2021), donde los genotipos de norovirus variaron según la estación climática del año y la edad de los pacientes. Estudios previos han mostrado cambios estacionales y predominancia variable de genotipos, como el desplazamiento de GII.4 por GII.17 que fue observado en Asia (Chan et al., 2015). En nuestro estudio, GII.4 fue el genotipo predominante por ambas técnicas de secuenciación, sin evidencias de GII.17. En un estudio realizado previamente en Uruguay, donde se analizaron muestras de aguas residuales provenientes de seis ciudades se observó una alta circulación de GII en todas las ciudades. Los genotipos detectados incluyeron GII.4 y GII.2 y también se observó el reemplazo de variantes de GII.4, de New Orleans 2009 a Sydney 2012. El patrón de distribución de genotipos varió entre las regiones del país analizadas (Victoria et al., 2016).

En el caso de los AstV, el genotipo MLB1 fue el más frecuentemente detectado, coincidiendo con estudios previos como el realizado en Chiang Mai (Kumthip et al., 2023). En nuestro trabajo, tanto por Sanger como por NGS, se detectaron MLB1 y el HAstV Clásico tipo 1. Sin embargo, por medio de NGS se identificó adicionalmente el genotipo MLB2 y una secuencia no clasificada, posiblemente correspondiente a un genotipo nuevo. Estos hallazgos subrayan la ventaja de NGS en la detección de variantes emergentes y poco comunes. A pesar de ello, la diversidad genotípica encontrada fue menor de lo esperado, considerando estudios como el realizado en Jian, China, donde en un año se detectaron múltiples variantes genotípicas, evidenciando la alta variabilidad de astrovirus en el ambiente (Du y colaboradores (2021), aunque no sería directamente comparable con nuestro país debido al número de habitantes de cada región que difiere muchísimo. En un trabajo realizado en Chiang Mai, Tailandia, utilizando secuenciación por Sanger, el genotipo que se encontró con mayor frecuencia fue el MLB1 (Kumthip et al., 2023). De forma similar, en nuestro estudio se detectó AstV perteneciente al genotipo MLB1, que fue identificado tanto por Sanger como por NGS. A pesar de que la PCR utilizada para la detección y posterior secuenciación de los AstV está diseñada para la detección de los astrovirus emergentes, se detectó el HAstV Clásico tipo1 por

ambas metodologías también. Previo a la realización de este estudio, esperábamos encontrar una mayor diversidad genotípica ya que los astrovirus presentan una gran diversidad genética tanto en muestras clínicas como en muestras de aguas residuales como lo observado en Jian, China durante un periodo de 12 meses (2016), donde en todos los meses fueron detectados por PCR convencional y secuenciados por Sanger astrovirus emergentes. En todas las muestras (n=342) se detectó las siguientes estirpes de astrovirus: MLB1 (n=60), MLB2 (n=35), VA1 (n=72), VA2 (n=112), VA3 (n=3), y VA5 (n=42), mientras que las 18 muestras restantes de astrovirus no pudieron ser clasificadas (Tao et al., 2019)

Varios trabajos han sugerido que los datos de NGS utilizados en estudios clínicos y en investigación son al menos tan precisos o en algunos casos hasta incluso más precisos que la secuenciación por Sanger (Tyler et al., 2016). La secuenciación por NGS ha demostrado ser una estrategia eficaz para el genotipado por ejemplo de HAdV en muestras de aguas residuales. Por medio de NGS se puede detectar una amplia gama de tipos "menos prevalentes" no identificados mediante la secuenciación convencional por Sanger, lo que confirma que los estudios basados en tecnologías convencionales pueden subestimar enormemente la existencia de algunos tipos, posiblemente menos abundantes (Iaconelli et al., 2017).

Análisis cuantitativo de riesgo microbiológico

Debido a que la exposición a aguas contaminadas con virus gastroentéricos puede afectar la salud de las personas expuestas, aumentar los costos de la atención médica y la pérdida de productividad de los empleados, es que consideramos utilizar la herramienta del análisis de riesgo para analizar la calidad microbiológica de una de nuestras principales playas de agua dulce, la cual es muy concurrida, principalmente en los meses de verano.

En los Estados Unidos, Collier y colaboradores (2021) estimaron la carga y el costo directo de la atención médica de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua, concluyendo que la vigilancia sistemática del agua es necesaria para prevenir enfermedades y reducir los costos asociados a la salud y a la pérdida

de días laborales. Las estimaciones lograron predecir que el costo total de pérdida económica por cuidados de salud y pérdidas de días laborales en los Estados Unidos es de 10.600 millones de dólares anuales (Bartsch et al., 2020), lo que consideramos es un costo económico elevado, por lo que implementar un análisis de QMRA para poder prevenir dichas enfermedades sería beneficioso no solo para evitar estos gastos sino que también, y más importante aún, salvaguardar la salud de los habitantes de las ciudades ribereñas.

En un trabajo realizado previamente por nuestro equipo se determinó el riesgo de infección por RVA de forma determinística en playas de los ríos Uruguay y Santa Lucía, estimándose riesgos diarios y anuales de infección para los bañistas. En dicho estudio se observó que la cuenca del río Santa Lucía presentó el mayor riesgo diario de infección ($6,41E-01$) y de enfermedad ($3,20E-01$) en el punto aguas abajo de la ciudad de Florida, mientras que en el río Uruguay, las mayores probabilidades de infección ($6,82E-01$) y enfermedad ($3,41E-01$) se estimaron en el sitio de captación de agua potable en la ciudad de Salto. Estos resultados indican que la contaminación por RVA afecta negativamente la calidad microbiológica de estos ríos tan importante para el Uruguay (Bortagaray et al., 2020). Debido a que este trabajo fue realizado con un enfoque determinístico, en esta tesis se realizó un estudio con un enfoque probabilístico, ya que este enfoque brinda una visión más completa de los posibles resultados, incluyendo los casos extremos, al considerar todas las posibilidades dentro de un rango de valores. En el presente trabajo, el mayor riesgo de infección se observó para RVA para los pescadores, alcanzando un 65% y el menor se observó para HAsV en mayores de 18 años para la actividad de nado con un 18% de probabilidad de infección, evidenciando que las probabilidades de infección por virus gastroentéricos en esa área del río Uruguay, teniendo en cuenta la actividad de pesca es elevada y superior al riesgo de infección para la actividad recreativa de nado. Para calcular dichos riesgos se utilizaron datos obtenidos de la detección y cuantificación por PCR en tiempo real, que a pesar de ser un método muy sensible, no permite discriminar entre virus infectivos y no infectivos (Hamza et al., 2011). En algunos trabajos se han adaptado las técnicas de qPCR a fin de poder detectar selectivamente aquellas partículas con cápsides intactas, potencialmente infecciosas, asumiéndolas como infectivas (Kevill et al., 2023). Algunos trabajos asumen que todos los patógenos detectados son

infectivos, lo cual puede generar incertidumbres en la evaluación del riesgo (Van Abel et al., 2017b). Para poder reducir estas incertidumbres se requieren de métodos que consideren la viabilidad e infectividad, como ser el cultivo celular, aunque para algunos virus tales como los norovirus, no están totalmente ajustadas las técnicas ya que presentan limitaciones en la propagación viral (Ettayebi et al., 2021; Winder et al., 2022). En los escenarios donde la información es limitada, el QMRA trabaja mediante suposiciones asociadas a sus respectivas probabilidades, un enfoque ampliamente reconocido en la evaluación de riesgos (NRC, 2009). La PCR/qPCR de integridad de la cápside utilizando colorantes se ha convertido en una técnica de gran utilidad e importancia en virología para poder detectar selectivamente partículas virales potencialmente infecciosas. Esta técnica evalúa la integridad de la cápside viral en matrices acuáticas mediante un ensayo de RT-qPCR combinado con el uso de colorantes foto-reactivos como PMAxx, que permite diferenciar entre virus infectivos y no infectivos. El PMAxx penetra en las cápsides dañadas con genomas expuestos, impidiendo su amplificación mediante PCR tras la exposición a luz, lo que permite distinguir los genomas virales encapsidados y potencialmente infecciosos de los no infectivos. (Kevill et al., 2023). En nuestro estudio utilizamos datos publicados de la frecuencia de virus infectivos donde compararon métodos moleculares de detección con métodos que permiten determinar las partículas infectivas (Espinosa et al., 2008).

Otro gran desafío al trabajar con la herramienta del QMRA con muestras ambientales es la determinación de la concentración viral ya que hay una gran proporción de muestras que resultan no detectables para el patógeno mediante la técnica de qPCR (muestras negativas), que están por debajo del límite de detección de la metodología utilizada, por lo que es importante abordar de manera especial las muestras con resultados no detectables para el patógeno evaluado en el conjunto de datos (Haas et al., 1999). En situaciones de ausencia de datos, la práctica común es recurrir a estimaciones conservadoras o del peor de los casos, con el objetivo de "estar en el lado seguro". Sin embargo, es importante tener en cuenta que las estimaciones del peor de los casos tienden a sobrestimar el riesgo (WHO, 2016). Poma y colaboradores (2019), analizaron diferentes escenarios para tratar a las muestras negativas por qPCR donde evidenciaron que reemplazar las no-detecciones por un único valor, como el

promedio o la mediana del límite de detección (LOD), simplificó los cálculos pero perdió información clave sobre las características individuales de cada muestra. Por otro lado, usar el LOD o la mitad del LOD capturó la singularidad de cada muestra, al reflejar el historial del procedimiento de concentración y método de detección utilizado. Sus hallazgos sugirieron que, en la mayoría de los casos, el uso del enfoque de la mitad del LOD sería el adecuado para los modelos de QMRA. Considerando esta situación es que en nuestro trabajo planteamos tres escenarios diferentes para analizar los datos no detectables, sin embargo, sorpresivamente observamos el mismo patrón de distribución de probabilidad de riesgo en los tres escenarios, por lo que podríamos inferir, que para nuestro grupo de datos, los valores no detectables no incidieron en el resultado final de riesgo, es decir, si hay pocos o muchos datos no detectables, el riesgo de infección sería independiente a esta variable y dependería más de las otras que componen la ecuación de probabilidad de riesgo como ser la cantidad de copias genómicas detectadas por la qPCR o el volumen de agua ingerido por los bañistas en cada evento de baño. La incidencia del volumen ingerido por cada evento de baño en el resultado final del riesgo de infección, se observa al comparar dichos riesgos para mayores y menores de 18 años, donde los menores presentan un mayor riesgo respecto a los mayores como consecuencia, principalmente, del mayor volumen ingerido (de forma involuntaria) de agua por cada evento de baño.

En nuestro país, la evaluación de la calidad del agua recreativa para la habilitación de las playas no incluye a los patógenos virales y es realizada por la Red de Monitoreo de Playas (RMP). Esta red opera bajo la coordinación del Ministerio de Ambiente y está integrada por las intendencias departamentales. Los parámetros que se analizan son la temperatura, pH, conductividad, salinidad y oxígeno disuelto, además de análisis bacteriológicos y realizar inspecciones visuales para detectar la presencia de cianobacterias u otros riesgos sanitarios (<https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/>). El poder realizar un monitoreo de virus gastroentéricos con su correspondiente QMRA sería un complemento fundamental a estos análisis mejorando la calidad microbiológica de nuestras playas.

A nivel mundial, como consecuencia de la pandemia de COVID-19, el uso de la vigilancia basada en aguas residuales (WBS) para monitorear la salud a nivel comunitario mediante la detección de patógenos dañinos causantes de enfermedades, excretados en heces y orina, ha aumentado considerablemente en los últimos años, demostrando la utilidad del WBS para el monitoreo de enfermedades y la implementación de políticas de salud pública (Kevill et al., 2023). Las aguas residuales constituyen una matriz química y biológica compleja que representa las comunidades humanas, animales y microbiológicas que contribuyen a ellas (Smith et al., 2024), por lo que analizar los patógenos que están presentes en ellas es de gran importancia para conocer la circulación de los mismos en la población. La vigilancia de virus en aguas residuales a largo plazo es una herramienta importante que sirve como base para la toma de decisiones a nivel de la salud humana ya que proporciona un sistema de alerta temprana en tiempo real sobre brotes de enfermedades infecciosas (Smith et al., 2024).

Poder monitorear las aguas residuales de una cuenca implica poder rastrear amenazas a la salud en la comunidad de una manera no invasiva y rentable (Smith et al., 2024), y si a esto se le suma el análisis de riesgo de infección en ese sitio, se podrían mitigar y prevenir brotes infecciosos y monitorear y consecuentemente prohibir baños en ciertas zonas donde circulen ciertos genotipos potencialmente peligrosos para la salud de la población.

Implementar la vigilancia epidemiológica en aguas residuales en combinación con el QMRA, sería particularmente útil durante los meses de verano en poblaciones ribereñas, donde estas aguas residuales se vierten (con o sin tratamiento) a los ríos que son utilizados para recreación. Este enfoque podría proporcionar información crucial a los ministerios de salud y a la población general con un costo económico relativamente bajo. Por ejemplo, determinar que el riesgo de infección por astrovirus es del 50% y que el genotipo predominante es neurotrópico (según un enfoque de vigilancia basada en aguas residuales, WBS) permitiría tomar decisiones informadas, como restringir el uso recreativo de esas aguas. Este conocimiento sobre los genotipos virales circulantes y su peligrosidad potencial, asociado a la probabilidad de infección, podría ser clave para implementar medidas preventivas que protejan la salud pública.

Sección VII- Conclusiones

- Se realizó la secuenciación de las estirpes virales para los tres virus estudiados tanto por la metodología de Sanger como por Secuenciación Profunda (NGS).
- En las aguas residuales los tres virus entéricos fueron identificados revelando su circulación y excreción en la población ribereña del Río Uruguay.
- Para RVA fue evidenciada una baja diversidad génica reflejada en un único genotipo para ambos genes estudiados.
- Con respecto a NoV fue detectada una alta diversidad génica ya que detectamos la co-circulación de varios genotipos tanto del Genogrupo I como del Genogrupo II.
- Para HAsTV, interesantemente fueron identificados varios genotipos no solo de los HAsTV emergentes que generan encefalitis, sino también de los HAsTV clásicos.
- Los tres virus fueron identificados en las aguas superficiales en una menor frecuencia y concentración que las aguas residuales.
- Fue posible determinar el riesgo de infección probabilístico para RVA y HAsTV tanto en el escenario de pesca como en el escenario de baño de recreación.
- Existe un riesgo de infección considerable para las personas que utilicen las aguas del Río Uruguay en los sitios analizados para los tres virus entéricos estudiados siendo mayor para los pescadores de Fray Bentos y menor para la actividad de nado en Las Cañas, revelando el impacto de la transmisión hídrica de las gastroenteritis virales en Uruguay.
- Este es el primer trabajo realizado en Uruguay donde se determinó la diversidad génica de estos tres virus entéricos por la tecnología de NGS, así como también el primero en determinar el riesgo de infección probabilístico

para estos mismos virus en un balneario tan importante como lo es Las Cañas.

- Esta tesis tiene una fortaleza importante porque constituye en sí mismo una colaboración científica de carácter interdisciplinario ya que involucró tanto a biólogos, ingenieros y matemáticos generando resultados sólidos académicamente.
- Se generó un programa “amigable” para el análisis de riesgo de infección que facilita la realización de estudios de QMRA para científicos no formados específicamente en esta área del conocimiento.
- Consideramos que es sumamente importante la construcción de plantas de tratamiento de aguas residuales para mitigar fuertemente la presencia de estos virus en las aguas residuales y por ende en las aguas superficiales, reduciendo considerablemente el impacto de estos virus en la salud humana por su vehiculación hídrica.

Sección VIII- Perspectivas

Luego de realizada esta tesis, desde el Laboratorio de Virología Molecular, nos hemos propuesto profundizar en el QMRA realizando análisis en las playas de Salto, con muestreos durante los meses de verano. Consideramos que sería enriquecedor poder realizar un muestreo durante dos veranos consecutivos, para poder realizar una comparación de riesgo entre un muestreo anual y otro estacional. También consideramos que sería muy importante dar a conocer en diferentes ámbitos estos resultados, para que diferentes actores, tales como intendencias municipales, OSE o Ministerio de Ambiente, puedan utilizar dicha herramienta para mitigar los efectos de los virus gastroentéricos aquí estudiados.

Como perspectiva también nos planteamos poder acoplar al QMRA el análisis de los DALYs, que es un indicador epidemiológico que mide la salud de una población o su carga de enfermedad en relación a una determinada afección o factor de riesgo. Este indicador puede ser considerado como una medida del tiempo perdido por discapacidad, enfermedad o muerte, comparado con una vida sin discapacidades en ausencia de dicha enfermedad (OMS, 2006). Los DALYs corresponden a los años perdidos debido a una enfermedad, por lo que sería interesante y pionero en el Uruguay poder llevar a cabo este estudio acoplado al QMRA y poder informar cuales serían los riesgos de poder contraer una enfermedad y brindar también la información acerca de cuánto tiempo se pierde de actividad laboral al estar enfermo debido a un virus gastroentérico.

En cuanto a la caracterización molecular nos planteamos como perspectiva extender la caracterización molecular a todas las ciudades ribereñas del Rio Uruguay así como también diseñar una estrategia para poder estudiar la circulación de las diferentes estirpes virales y sus genotipos según las estaciones del año.

Sección IX- Bibliografía

Alam, A., Quresh, S. A., Vinjé, J., & Zaidi, A. (2016). Genetic Characterization of Norovirus Strains in Hospitalized Children From Pakistan. *Journal Medical of Virology*, 216-223.

Amarasiri M, Sano D. Specific Interactions between Human Norovirus and Environmental Matrices: Effects on the Virus Ecology. *Viruses*. 2019 Mar 5;11(3):224. doi: 10.3390/v11030224. PMID: 30841581; PMCID: PMC6466409.

Appleton, H. & P. G. Higgins. 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1: 1297

Arowolo KO, Ayolabi CI, Adeleye IA, Lapinski B, Santos JS, Raboni SM. Molecular epidemiology of astrovirus in children with gastroenteritis in southwestern Nigeria. *Arch Virol*. 2020 Nov;165(11):2461-2469. doi: 10.1007/s00705-020-04741-0. Epub 2020 Aug 8. PMID: 32770482; PMCID: PMC7414288.

Artika IM, Wiyatno A, Ma'roef CN. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect Genet Evol*. 2020 Jul;81:104215. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104215. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32006706; PMCID: PMC7106233.

Balasingham, K. D., Walter, R. P., & Heath, D. D. (2017). Residual eDNA detection sensitivity assessed by quantitative real-time PCR in a river ecosystem. *Molecular Ecology Resources*, 17, 523-532. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12598>

Bao S, Wang H, Li W, Wu H, Lu C, Yong L, Zhang Q, Lu X, Zhao M, Lu J, Liu J, Ikechukwu CK, Xu J, Ni P, Xiong Y, Zhang W, Zhou C. Viral metagenomics of the gut virome of diarrheal children with Rotavirus A infection. *Gut Microbes*. 2023 Jan-Dec;15(1):2234653. doi: 10.1080/19490976.2023.2234653. PMID: 37448101; PMCID: PMC10351451.

Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra LJ, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol*. 2010 Jul;82(7):1277-81. doi: 10.1002/jmv.21800. PMID: 20513096.

Bartsch SM; O'Shea KJ; Lee BY The Clinical and Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis* 2020, 222 (11), 1910-1919. [PubMed: 32671397]

Bellido Blasco, J. B. (2006). *Epidemiología de las Gastroenteritis Agudas Víricas*. Valencia, España: Sociedad Española de Epidemiología.

Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. Elsevier; 2020).

Bellido Blasco, J. B. (Coord.). (2007). *Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas: Aspectos actuales* (6ª Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología). EMISA. Bleotu C, Matei L, Dragu LD, Necula LG, Pitica IM, Chivu-Economescu M, Diaconu CC. Viruses in Wastewater-A Concern for Public Health and the Environment. *Microorganisms*. 2024 Jul 14;12(7):1430. doi: 10.3390/microorganisms12071430. PMID: 39065197; PMCID: PMC11278728.

Berois M, Libersou S, Russi J, Arbiza J, Cohen J. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999. *J Med Virol*. 2003 Nov;71(3):456-62. doi: 10.1002/jmv.10511. PMID: 12966554.

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.

Bleotu C, Matei L, Dragu LD, Necula LG, Pitica IM, Chivu-Economescu M, Diaconu CC. Viruses in Wastewater-A Concern for Public Health and the Environment. *Microorganisms*. 2024 Jul 14;12(7):1430. doi: 10.3390/microorganisms12071430. PMID: 39065197; PMCID: PMC11278728.

Bortagaray V, Girardi V, Pou S, Lizasoain A, Tort LFL, Spilki FR, Colina R, Victoria M. Detection, Quantification, and Microbial Risk Assessment of Group A Rotavirus in Rivers from Uruguay. *Food Environ Virol*. 2020 Jun;12(2):89-98. doi: 10.1007/s12560-019-09416-x. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31792742.

Bortagaray V, Matias S, Daiana M, Rodney C, Matias V. Molecular Characterization of Gastroenteric Viruses in Wastewater from Cities in Uruguay. *Food Environ Virol*. 2023 Dec;15(4):318-330. doi: 10.1007/s12560-023-09567-y. Epub 2023 Oct 24. PMID: 37872461.

Bosch, A., Guix, S., Sano, D., & Pinto, R. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 295-301.

Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct;27(4):1048-74. doi: 10.1128/CMR.00013-14. PMID: 25278582; PMCID: PMC4187635.

Brouwer AF, Masters NB, Eisenberg JNS. Quantitative Microbial Risk Assessment and Infectious Disease Transmission Modeling of Waterborne Enteric Pathogens. *Curr Environ Health Rep*. 2018 Jun;5(2):293-304. doi: 10.1007/s40572-018-0196-x. PMID: 29679300; PMCID: PMC5984175.

Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global Impact of Rotavirus Vaccination on Diarrhea Hospitalizations and Deaths Among Children <5 Years Old: 2006-2019. *J Infect Dis*. 2020 Oct 13;222(10):1731-1739. doi: 10.1093/infdis/jiaa081. PMID: 32095831; PMCID: PMC7483971.

Carlson JAK, Middleton PJ, Szymanski MT, Huber J, Petric M (1978) Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *Am J Dis Child* 132:477-479

Carmona, A. P. B., & Moroyoqui, P. G. (2011). El procedimiento de la evaluación cuantitativa de riesgos en la predicción de peligros biológicos. *Ide@s CONCYTEG*.

CDC, 2024. <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/worldwide-sp.html>

Chan Merchán, M., Torres Caicedo, M. I., & Díaz Torres, A. K. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796-807.

Chhabra, P., De Graaf, M., Parra, G., Chi-Wai Chan, M., Green, K., Martella, V., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of general virology*, 1393-1406.

Chan MC, Lee N, Hung TN, Kwok K, Cheung K, Tin EK, Lai RW, Nelson EA, Leung TF, Chan PK. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat Commun*. 2015;6(1):10061. doi:10.1038/ncomms10061.

Chen YL, Huang CT. Establishment of a two-step purification scheme for tag-free recombinant Taiwan native norovirus P and VP1 proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020 Nov 30;1159:122357. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122357. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32920339.

Chigor VN, Sibanda T, Okoh AI. Assessment of the risks for human health of adenoviruses, hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and three source water dams

in the Eastern Cape. *Food Environ Virol.* 2014 Jun;6(2):87-98. doi: 10.1007/s12560-014-9138-4. Epub 2014 Mar 28. PMID: 24676673.

Cioffi, B., Monini, M., Salamone, M., Pellicano, R., Di Bartolo, I., Guida, M., La Rosa, G., Fusco, G., 2020. Environmental surveillance of human enteric viruses in wastewaters, groundwater, surface water and sediments of Campania Region. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 38, 101368.

Collier, S.A., Deng, L., Adam, E.A., Benedict, K.M., Beshearse, E.M., Blackstock, A.J., Bruce, B.B., Derado, G., Edens, C., Fullerton, K.E., Gargano, J.W., Geissler, A.L., Hall, A.J., Havelaar, A.H., Hill, V.R., Hoekstra, R.M., Reddy, S.C., Scallan, E., Stokes, E.K., Yoder, J.S., Beach, M.J., 2021. Estimate of burden and direct healthcare cost of infectious waterborne disease in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 140-149. <https://doi.org/10.3201/eid2701.190676>

Coppo P, Scieux C, Ferchal F, Clauvel J, Lassoued K. Astrovirus enteritis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with fludarabine monophosphate. *Ann Hematol.* 2000 Jan;79(1):43-5. doi: 10.1007/s002770050008. PMID: 10663621.

Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Molyneux ME, Hart CA. Detection of enteric adenoviruses in children with acute gastro-enteritis in Blantyre, Malawi. *Ann Trop Paediatr.* 2002 Sep;22(3):267-9. doi: 10.1179/027249302125001561. PMID: 12369493.

da Silva, M., Miagostovich, M., Victoria, M. 2016. Rotavirus and Astroviruses. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Global Water Pathogens Project*. <http://www.waterpathogens.org> (J.S Meschke, and R. Girones (eds) Part 3 Viruses) <http://www.waterpathogens.org/book/rotavirus> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO

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.

De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol.* 2011 Oct;11(7):1529-44. doi: 10.1016/j.meegid.2011.07.024. Epub 2011 Aug 5. PMID: 21843659; PMCID: PMC7185765.

de Deus DR, Teixeira DM, Dos Santos Alves JC, Smith VC, da Silva Bandeira R, Siqueira JAM, de Sá Morais LLC, Resque HR, Gabbay YB. Occurrence of norovirus genogroups I and II in recreational water from four beaches in Belém city, Brazilian Amazon region. *J Water Health.* 2019 Jun;17(3):442-454. doi: 10.2166/wh.2019.304. PMID: 31095519.

Degiuseppe, J. I., Barclay, L., Gomes, K. A., Costantini, V., Vinjé, J., & Stupka, J. A. (2020). Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Argentina, 2013-2018. *Journal of medical virology*, 92(8), 1330-1333.

Domínguez, A., Godoy, P., Torner, N., Cardeñosa, N., & Martínez, A. (2009). Las gastroenteritis víricas: un problema de salud pública. *Revista española de salud pública*, 83, 679-687.

Du H, Xiong P, Ji F, Lin X, Wang S, Zhang L, Liu Y, Song Y, Tao Z, Xu A. Genetic diversity and molecular epidemiological characterization of group A rotaviruses in raw sewage in Jinan by next generation sequencing. *Infect Genet Evol.* 2021 Jul;91:104814. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104814. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33753310.

Dufour AP, Behymer TD, Cantú R, Magnuson M, Wymer LJ. Ingestion of swimming pool water by recreational swimmers. *J Water Health.* 2017 Jun;15(3):429-437. doi: 10.2166/wh.2017.255. PMID: 28598347.

El-Attar L, Dhaliwal W, Iturriza-Gómara M, Bridger JC. Identification and molecular characterization of a bovine G3 rotavirus which causes age-independent diarrhea in cattle. *J. Clin. Microbiol* 2002;40:937-942.

Eliseev A, Gibson KM, Avdeyev P, Novik D, Bendall ML, Pérez-Losada M, Alexeev N, Crandall KA. Evaluation of haplotype callers for next-generation sequencing of viruses. *Infect Genet Evol.* 2020 Aug;82:104277. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104277. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32151775; PMCID: PMC7293574.

Ennuschat N, Härtel S, Pietsch C, Liebert UG. Norovirus Epidemiology and Genetic Diversity in Leipzig, Germany during 2013-2017. *Viruses.* 2021 Sep 29;13(10):1961. doi: 10.3390/v13101961. PMID: 34696390; PMCID: PMC8541062.

EPA, U. (2017). Potable reuse compendium. EPA 810-R-17-002 2017. Office of Ground Water and Drinking Water: Washington, DC.

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. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.018>

Esposito, S., & Principi, N. (2020). Norovirus vaccine: priorities for future research and development. *Frontiers in immunology*, 11, 1383.

Estes, M. K., & Greenberg, H. B. (2013). Rotaviruses. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6th ed., Vol. II, pp. 1347- 1401). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Estes, MK.; Kapikian, AZ. Rotaviruses. In: Knipe, DM.; Howley, PM., et al., editors. *Fields Virology*. 5th ed.. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA: 2007. p. 1917-1974.

Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotaviruses: a review. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1983;105:123-84. doi: 10.1007/978-3-642-69159-1_3. PMID: 6313296.

Ettayebi K, Tenge VR, Cortes-Penfield NW, Crawford SE, Neill FH, Zeng XL, Yu X, Ayyar BV, Burrin D, Ramani S, Atmar RL, Estes MK. New Insights and Enhanced Human Norovirus Cultivation in Human Intestinal Enteroids. *mSphere.* 2021 Jan 27;6(1):e01136-20. doi: 10.1128/mSphere.01136-20. PMID: 33504663; PMCID: PMC7885322.

Federigi I, Bonadonna L, Bonanno Ferraro G, Briancesco R, Cioni L, Coccia AM, Della Libera S, Ferretti E, Gramaccioni L, Iaconelli M, La Rosa G, Lucentini L, Mancini P, Suffredini E, Vicenza T, Veneri C, Verani M, Carducci A. Quantitative Microbial Risk Assessment as support for bathing waters profiling. *Mar Pollut Bull.* 2020 Aug;157:111318. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111318. Epub 2020 May 31. PMID: 32658683.

Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, Kang G, Wang D. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology.* 2009 Oct 8;6:161. doi: 10.1186/1743-422X-6-161. PMID: 19814825; PMCID: PMC2765957.

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.

Fong T, 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, 69:357-371.

- Fumian, T. M., Fioretti, J. M., Lun, J. H., Dos Santos, I. A., White, P. A., & Miagostovich, M. P. (2019). Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing. *Environment International*, 282-291.
- 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 Mar;11(1):110-9. doi: 10.2166/wh.2012.123. PMID: 23428554.
- Galdos-Balzategui, A., Carmona de la Torre, J., Sánchez-Pérez, H. J., Morales-López, J. J., Torres-Dosal, A., & Gómez-Urbina, S. (2017). Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico por consumo de agua en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. *Tecnología y ciencias del agua*, 8(1), 133-153
- Gamazo P, Victoria M, Schijven JF, Alvareda E, Tort LFL, Ramos J, Lizasoain LA, Sapriza G, Castells M, Bessone L, Colina R. Modeling the Transport of Human Rotavirus and Norovirus in Standardized and in Natural Soil Matrix-Water Systems. *Food Environ Virol*. 2020 Mar;12(1):58-67. doi: 10.1007/s12560-019-09414-z. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31721078.
- Gerba, C. P. (2007). Virus survival in the environment: A review. *Environmental Science & Technology*, 41(3), 731-742.
- Gerba, C. P., & Goyal, S. M. (1978). Detection and occurrence of enteric viruses in water and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(4), 544-550.
- Gersberg, R., Rose, M., Robles-Sikisaka, R., & Dhar, A. (2006). Quantitative detection of hepatitis A virus and enteroviruses near the United States-Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7438
- Gensberger ET, Kostić T. Novel tools for environmental virology. *Curr Opin Virol*. 2013 Feb;3(1):61-8. doi: 10.1016/j.coviro.2012.11.005. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23246441
- Gough RE, Collins MS, Borland E, Keymer LF. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet Rec*. 1984 Mar 17;114(11):279. doi: 10.1136/vr.114.11.279-a. PMID: 6424324.
- Greening, G. E., & Cannon, J. L. (2016). Human and animal viruses in food (including taxonomy of enteric viruses). *Viruses in foods*, 5-57.
- Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martínez J, Rosales G, Velázquez FR, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J*. 1998 Aug;17(8):723-7. doi: 10.1097/00006454-199808000-00012. PMID: 9726348.
- Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, Simó M, Bosch A, Pintó RM. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):133-9. doi: 10.1128/JCM.40.1.133-139.2002. PMID: 11773106; PMCID: PMC120088.
- Gutierrez MB, Fialho AM, Maranhão AG, Malta FC, Andrade JDSR, Assis RMS, Mouta SDSE, Miagostovich MP, Leite JPG, Machado Fumian T. Rotavirus A in Brazil: Molecular Epidemiology and Surveillance during 2018-2019. *Pathogens*. 2020 Jun 27;9(7):515. doi: 10.3390/pathogens9070515. PMID: 32605014; PMCID: PMC7400326.
- Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 1999. Quantitative Microbial Risk Assessment. John Wiley & Sons.

Hamouda MA, Jin X, Xu H, Chen F. Quantitative microbial risk assessment and its applications in small water systems: A review. *Sci Total Environ.* 2018 Dec 15;645:993-1002. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.228. Epub 2018 Jul 20. PMID: 30248886.

Hamza H, Hamza IA. Oncogenic papillomavirus and polyomavirus in urban sewage in Egypt. *Sci Total Environ.* 2018 Jan 1;610-611:1413-1420. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.218. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28854484.

Hasing ME, Lee BE, Qiu Y, Xia M, Pabbaraju K, Wong A, Tipples G, Jiang X, Pang XL. Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012-2018. *BMC Infect Dis.* 2019 Feb 19;19(1):177. doi: 10.1186/s12879-019-3792-y. PMID: 30782126; PMCID: PMC6381812.

Hast D.-L. Vu, S. Cordey, F. Brito, L. Kaiser, Novel human astroviruses: Novel human diseases? *J. Clin. Virol.* 82 (2016) 56-63, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.004>.

Hata A., H. Katayama, M. Kitajima, H. Furumai, Wastewater analysis indicates that genetically diverse astroviruses, including strains belonging to novel clades MLB and VA, are circulating within Japanese populations, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 4932-4939, <https://doi.org/10.1128/AEM.00563-15>.

Hata A, Kitajima M, Haramoto E, Lee S, Ihara M, Gerba CP, Tanaka H. Next-generation amplicon sequencing identifies genetically diverse human astroviruses, including recombinant strains, in environmental waters. *Sci Rep.* 2018 Aug 7;8(1):11837. doi: 10.1038/s41598-018-30217-y. PMID: 30087387; PMCID: PMC6081416.

Hellmér M, Paxéus N, Magnius L, Enache L, Arnholm B, Johansson A, Bergström T, Norder H. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Nov;80(21):6771-81. doi: 10.1128/AEM.01981-14. Epub 2014 Aug 29. PMID: 25172863; PMCID: PMC4249052.

Hjelmsø MH, Hellmér M, Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Lukjancenko O, Seidel M, Elsässer D, Aarestrup FM, Löfström C, Bofill-Mas S, Abril JF, Girones R, Schultz AC. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS One.* 2017 Jan 18;12(1):e0170199. doi: 10.1371/journal.pone.0170199. PMID: 28099518; PMCID: PMC5242460.

Iaconelli M., Valdazo-González B., Equestre M., Ciccaglione A.R., Marcantonio C., Della Libera S., G., Molecular characterization of human adenoviruses in urban wastewaters using next generation and Sanger sequencing, *Water Research*, Volume 121, 2017, Pages 240-247,ISSN 0043-1354,<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.039>.

Imada T, Yamaguchi S, Kawamura H. Pathogenicity for baby chicks of the G-4260 strain of the picornavirus "avian nephritis virus". *Avian Dis.* 1979 Jul-Sep;23(3):582-8. PMID: 230802.

Johnson C, Hargest V, Cortez V, Meliopoulos VA, Schultz-Cherry S. Astrovirus Pathogenesis. *Viruses.* 2017 Jan 22;9(1):22. doi: 10.3390/v9010022. PMID: 28117758; PMCID: PMC5294991.

Julian TR, Schwab KJ: Challenges in environmental detection of human viral pathogens. *Curr Opin Virol* 2012, 2:78-83. 8.

Juliao P, Guzman-Holst A, Gupta V, Velez C, Petrozzi V, Ochoa TJ. Acute Gastroenteritis Morbidity and Mortality Trends Following Universal Rotavirus Vaccination in Children in Peru: Ecological Database Study with Time-Trend Analysis. *Infect Dis Ther.* 2021 Dec;10(4):2563-2574. doi: 10.1007/s40121-021-00532-5. Epub 2021 Sep 5. PMID: 34482530; PMCID: PMC8572903.

Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods.* 2017 Jun;14(6):587-589. doi:

10.1038/nmeth.4285. Epub 2017 May 8. PMID: 28481363; PMCID: PMC545324

Khalifa ME, Varsani A, Ganley ARD, Pearson MN. Comparison of Illumina de novo assembled and Sanger sequenced viral genomes: A case study for RNA viruses recovered from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Res.* 2016 Jul 2;219:51-57. doi: 10.1016/j.virusres.2015.11.001. Epub 2015 Nov 12. PMID: 26581665.

Kevill JL, Farkas K, Ridding N, Woodhall N, Malham SK, Jones DL. Use of Capsid Integrity-qPCR for Detecting Viral Capsid Integrity in Wastewater. *Viruses.* 2023 Dec 26;16(1):40. doi: 10.3390/v16010040. PMID: 38257740; PMCID: PMC10819219.

Kim JY, Lee H, Lee JE, Chung MS, Ko GP. Identification of human and animal fecal contamination after rainfall in the Han River, Korea. *Microbes Environ.* 2013;28(2):187-94. doi: 10.1264/jsme2.me12187. Epub 2013 May 11. PMID: 23666535; PMCID: PMC4070672.

Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol.* 2010 Sep 15;44(18):7116-22. doi: 10.1021/es100346a. PMID: 20715862.

Kittigul L, Pombubpa K. Rotavirus Surveillance in Tap Water, Recycled Water, and Sewage Sludge in Thailand: A Longitudinal Study, 2007-2018. *Food Environ Virol.* 2021 Mar;13(1):53-63. doi: 10.1007/s12560-020-09450-0. Epub 2020 Oct 31. PMID: 33128701.

Kluge M, Fleck JD, Soliman MC, Luz RB, Fabres RB, Comerlato J, Silva JVS, Staggemeier R, Vecchia AD, Capalonga R, Oliveira AB, Henzel A, Rigotto C, Spilki FR. 2014. Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. *J Water Health* 12:526-532. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.202>.

Koci MD, Seal BS, Schultz-Cherry S. Molecular characterization of an avian astrovirus. *J Virol.* 2000 Jul;74(13):6173-7. doi: 10.1128/jvi.74.13.6173-6177.2000. PMID: 10846102; PMCID: PMC112117.

Komoto S, Ide T, Negoro M, Tanaka T, Asada K, Umemoto M, Kuroki H, Ito H, Tanaka S, Ito M, Fukuda S, Suga S, Kamiya H, Nakano T, Taniguchi K. Characterization of unusual DS-1-like G3P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Japan. *J Med Virol.* 2018 May;90(5):890-898. doi: 10.1002/jmv.25016. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29315643.

Kotloff KL, Platts-Mills JA, Nasrin D, Roose A, Blackwelder WC, Levine MM. Global burden of diarrheal diseases among children in developing countries: Incidence, etiology, and insights from new molecular diagnostic techniques. *Vaccine.* 2017 Dec 14;35(49 Pt A):6783-6789. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.07.036. Epub 2017 Jul 29. PMID: 28765005.

Kumthip K, Khamrin P, Ushijima H, Maneekarn N. Detection of Six Different Human Enteric Viruses Contaminating Environmental Water in Chiang Mai, Thailand. *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 14;11(1):e0351222. doi: 10.1128/spectrum.03512-22. Epub 2022 Dec 19. PMID: 36533933; PMCID: PMC9927274.

Lee JB, Youn SJ, Nakagomi T, Park SY, Kim TJ, Song CS, Jang HK, Kim BS, Nakagomi O. Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus. *Arch. Virol* 2003;148:643- 657.

Lee YW, Yang SI, Kim JM, Kim JY. Clinical features and role of viral isolates from stool samples of intussusception in children. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013 Sep;16(3):162-70. doi: 10.5223/pghn.2013.16.3.162. Epub 2013 Sep 30. PMID: 24224149; PMCID: PMC3819690.

Lin X, Zou R, Liu Y, Ji F, Tao Z, Xu A. Continuous detection of norovirus and astrovirus in wastewater in a coastal city of China in 2014-2016. *Lett Appl Microbiol.* 2021 Oct;73(4):418-425. doi: 10.1111/lam.13530. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34176155.

Lin X, Xu M, Zhao Y, Ji F, Liu Y, Wang S, Chen M, Zhang W, Tao Z, Xu A. Environmental Surveillance of Human Astroviruses in Jinan City of China, 2020-2021. *Food Environ Virol.* 2024 Mar;16(1):50-57. doi: 10.1007/s12560-023-09576-x. Epub 2024 Jan 11. PMID: 38212480.

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. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26010679.

Lopman BA, Trivedi T, Vicuña Y, Costantini V, Collins N, Gregoricus N, Parashar U, Sandoval C, Broncano N, Vaca M, Chico ME, Vinjé J, Cooper PJ. Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status. *J Infect Dis.* 2015 Jun 1;211(11):1813-21. doi: 10.1093/infdis/jiu672. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25505295; PMCID: PMC4425937.

Lun JH, Hewitt J, Yan GJH, Enosi Tuipulotu D, Rawlinson WD, White PA. Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 Was the Dominant Norovirus Identified in Australia and New Zealand in 2017. *Viruses.* 2018 Oct 9;10(10):548. doi: 10.3390/v10100548. PMID: 30304780; PMCID: PMC6213408.

Mabasa VV, van Zyl WB, Ismail A, Allam M, Taylor MB, Mans J. Multiple Novel Human Norovirus Recombinants Identified in Wastewater in Pretoria, South Africa by Next-Generation Sequencing. *Viruses.* 2022 Dec 7;14(12):2732. doi: 10.3390/v14122732. PMID: 36560736; PMCID: PMC9788511.

Mandile MG, Esteban LE, Argüelles MH, Mistchenko A, Glikmann G, Castello AA. 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. *J Clin Virol.* 2014 Jul;60(3):282-9. doi: 10.1016/j.jcv.2014.04.022. Epub 2014 May 4. PMID: 24875137.

Martínez-Puchol S, Rusiñol M, Fernández-Cassi X, Timoneda N, Itarte M, Andrés C, Antón A, Abril JF, Girones R, Bofill-Mas S. Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Sci Total Environ.* 2020 Apr 15;713:136604. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136604. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31955099.

Masachessi G, Pisano MB, Prez VE, Martínez LC, Michelena JF, Martínez-Wassaf M, Giordano MO, Isa MB, Pavan JV, Welter A, Nates SV, Ré V. Enteric Viruses in Surface Waters from Argentina: Molecular and Viable-Virus Detection. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Feb 14;84(5):e02327-17. doi: 10.1128/AEM.02327-17. PMID: 29269500; PMCID: PMC5812940.

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.

MfE, M. (2003). Microbiological water quality guidelines for marine and freshwater recreational areas.

Middleton PJ (1978) Pathogenesis of rota viral infection. *J Am Vet Med Assoc* 173:544-546

Miura, T., Takino, H., Gima, A., Haramoto, E., and Akiba, M. (2021). Recovery of nucleic acids of enteric viruses and host-specific Bacteroidales from groundwater by using an adsorption-direct extraction method. *Appl. Environ. Microbiol.* 87:e00710-21. doi: 10.1128/AEM.00710-21.

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 Mar;38(3):1058-62. doi: 10.1128/JCM.38.3.1058-1062.2000. PMID: 10698996; PMCID: PMC86338.

Nafea AM, Wang Y, Wang D, Salama AM, Aziz MA, Xu S and Tong Y (2024) Application of next-generation sequencing to identify different pathogens. *Front. Microbiol.* 14:1329330. doi: 10.3389/fmicb.2023.1329330.

Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Wierzb TF, French RW, Monroe SS, Glass RI, Clemens JD. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J Infect Dis.* 2000 Sep;182(3):685-90. doi: 10.1086/315763. Epub 2000 Aug 17. PMID: 10950760.

NHMRC, A. (2008). Guidelines for Managing Risks in Recreational Water. National Health and Medical Research Council AG, editor. Canberra: Australian Government.

Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses.* 2019 Mar 6;11(3):226. doi: 10.3390/v11030226. PMID: 30845670; PMCID: PMC6466115.

Ouermi D, Soubeiga D, Nadembega WMC, Sawadogo PM, Zohoncon TM, Obiri-Yeboah D, Djigma FW, Nordgren J, Simpore J. Molecular Epidemiology of Rotavirus in Children under Five in Africa (2006-2016): A Systematic Review. *Pak J Biol Sci.* 2017;20(2):59-69. doi: 10.3923/pjbs.2017.59.69. PMID: 29022996.

Olesen SW, Imakaev M, Duvallet C. Making waves: Defining the lead time of wastewater-based epidemiology for COVID-19. *Water Res.* 2021 Sep 1;202:117433. doi: 10.1016/j.watres.2021.117433. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34304074; PMCID: PMC8282235.

OMS. (07 de Marzo de 2024). Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 20 de Abril de 2024, de Enfermedades diarreicas: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.

OMS (Organización Mundial de la Salud (2006). Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Pang X, Gao T, Qiu Y, Caffrey N, Popadynetz J, Younger J, Lee BE, Neumann N, Checkley S. 2021. The prevalence and levels of enteric viruses in groundwater of private wells in rural Alberta, Canada. *Water Res* 202:117425. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117425>.

Parkin NT, Avila-Rios S, Bibby DF, Brumme CJ, Eshleman SH, Harrigan PR, Howison M, Hunt G, Ji H, Kantor R, Ledwaba J, Lee ER, Matías-Florentino M, Mbisa JL, Noguera-Julian M, Paredes R, Rivera-Amill V, Swanstrom R, Zaccaro DJ, Zhang Y, Zhou S, Jennings C. Multi-Laboratory Comparison of Next-Generation to Sanger-Based Sequencing for HIV-1 Drug Resistance Genotyping. *Viruses.* 2020 Jun 27;12(7):694. doi: 10.3390/v12070694. PMID: 32605062; PMCID: PMC7411816.

Peraza, L. D. A., Kischinevzky, C. S., Sánchez, V. E., Lois, L. A., & López, V. V. (2017). Más allá de la secuenciación. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2), 37-38.

Pina S , Puig M , Lucena F , Jofre J , Girones R (1998) Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses . *Appl Environ Microbiol* 64 : 3376 – 3382

Polo, D., Quintela-Baluja, M., Corbishley, A., Jones, D. L., Singer, A. C., Graham, D. W., & Romalde, J. L. (2020). Making waves: wastewater-based epidemiology for COVID-19-approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water research*, 186, 116404.

Poma HR, Kundu A, Wuertz S, Rajal VB. Data fitting approach more critical than exposure scenarios and treatment of censored data for quantitative microbial risk assessment. *Water Res.* 2019 May 1;154:45-53. doi: 10.1016/j.watres.2019.01.041. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30771706.

Prado T, Miagostovich MP. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa [Environmental virology and sanitation in Brazil: a narrative review]. *Cad Saude Publica*. 2014 Jul;30(7):1367-78. Portuguese. doi: 10.1590/0102-311x00109213. PMID: 25166934.

Prez VE, Gil PI, Temprana CF, Cuadrado PR, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Isa MB, Ré VE, Paván JV, Nates SV, Barril PA. Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Sci Total Environ*. 2015 Dec 15;538:220-9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.041. Epub 2015 Aug 24. PMID: 26311578.

Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L. & Wurtzer, S. (2016) Viral persistence in surface and drinking water: suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Research*, 91, 68-76.

Randazzo W, D'Souza DH, Sanchez G. Norovirus: The Burden of the Unknown. *Adv Food Nutr Res*. 2018;86:13-53. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.02.005. Epub 2018 May 21. PMID: 30077220.

Rashid M, Khan MN, Jalbani N. 2021. Detection of human adenovirus, rotavirus, and enterovirus in tap water and their association with the overall quality of water in Karachi, Pakistan. *Food Environ Virol* 13:44-52. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09448-8>.

RCWG, Rotavirus Classification Working Group (2018) Newly assigned genotypes—update May 29th. 2018. Retrieved October 15, 2019 from <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>

Ribes Fernández, J. M., & Buesa Gómez, J. (2010). Infecciones por Norovirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica.*, 51-55.

Ritchie, A., Hung, A., & Gómez-Sánchez, M. (2018). Detección de Norovirus GI Y GII en muestras de agua del Río Piura mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 6(2), 47-47.

Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):134-64. doi: 10.1128/CMR.00075-14.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open-source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Rovida F, Nepita EV, Giardina F, Piralla A, Campanini G, Baldanti F. Rotavirus molecular epidemiology in hospitalized patients, Northern Italy, 2015-2018. *New Microbiol*. 2020 Jan;43(1):1-5. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31814030.

Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2), 49-63.

Sanborn, M., Takaro, T., 2013. Recreational water-related illness: office management and prevention. *Can. Fam. Physician* 59, 491-495.

Santos VS, Berezin EN, Gurgel RQ. Rotavirus in Latin America: Current Situation and Perspectives. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017 Mar 1;6(1):1-2. doi: 10.1093/jpids/piw071. PMID: 28391328.

Shaffer, M., Huynh, K., Costantini, V., Bibby, K., Vinjé, J., 2022. Viable Norovirus Persistence in Water Microcosms. *Environ. Sci. Technol. Lett*. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00553>.

Shim JO, Chang JY, Shin S, Moon JS, Ko JS. Changing distribution of age, clinical severity, and genotypes of rotavirus gastroenteritis in hospitalized children after the introduction of vaccination: a single center study in Seoul between 2011 and 2014. *BMC Infect Dis.* 2016 Jun 14;16:287. doi: 10.1186/s12879-016-1623-y. PMID: 27296987; PMCID: PMC4906974.

Simhon, A. (1985). Virología de los rotavirus y epidemiología de la diarrea por rotavirus. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 98 (4), abr. 1985.

Smith MF, Maqsood R, Sullins RA, Driver EM, Halden RU, Lim ES. Seasonality of respiratory, enteric, and urinary viruses revealed by wastewater genomic surveillance. *mSphere.* 2024 May 29;9(5):e0010524. doi: 10.1128/msphere.00105-24. Epub 2024 May 7. PMID: 38712930; PMCID: PMC11237574.

Stauber C, Jacob-Nascimento LC, Grosch C, Sousa MDS, Portilho MM, Anjos RO, Brinton MA, Kitron U, Reis MG, Ribeiro GS. Presence of dengue virus RNA in urine and oral fluid of laboratory-confirmed dengue patients: Implications for wastewater surveillance. *Braz J Infect Dis.* 2025 Jan-Feb;29(1):104484. doi: 10.1016/j.bjid.2024.104484. Epub 2024 Nov 29. PMID: 39612524; PMCID: PMC11646746.

Straub TM, Chandler DP. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *J Microbiol Methods.* 2003; 53: 185-97.

Suffredini E, Iaconelli M, Equestre M, Valdazo-González B, Ciccaglione AR, Marcantonio C, Della Libera S, Bignami F, La Rosa G. Genetic Diversity Among Genogroup II Noroviruses and Progressive Emergence of GII.17 in Wastewaters in Italy (2011-2016) Revealed by Next-Generation and Sanger Sequencing. *Food Environ Virol.* 2018 Jun;10 (2):141-150. doi: 10.1007/s12560-017-9328-y. Epub 2017 Nov 28. Erratum in: *Food Environ Virol.* 2018 Jun;10 (2):222-223. doi: 10.1007/s12560-018-9346-4. PMID: 29185203.

Tan B, Ng C, Nshimiyimana JP, Loh LL, Gin KY, Thompson JR. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front Microbiol.* 2015 Sep 25;6:1027. doi: 10.3389/fmicb.2015.01027. PMID: 26441948; PMCID: PMC4585245.

Tao Z, Wang H, Zhang W, Xu A. Novel astrovirus types circulating in Shandong Province (Eastern China) during 2016: A clinical and environmental surveillance. *J Clin Virol.* 2019 Jul;116:69-73. doi: 10.1016/j.jcv.2019.05.005. Epub 2019 May 12. PMID: 31125792.

Tao Z, Lin X, Liu Y, Ji F, Wang S, Xiong P, Zhang L, Xu Q, Xu A, Cui N. Detection of multiple human astroviruses in sewage by next generation sequencing. *Water Res.* 2022 Jun 30;218:118523. doi: 10.1016/j.watres.2022.118523. Epub 2022 Apr 29. PMID: 35525029.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1468-76. doi: 10.1002/jmv.21237. PMID: 18551613.

Tort LF, Victoria M, Lizasoain A, García M, Berois M, Cristina J, Leite JP, Gómez MM, Miagostovich MP, Colina R. Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay. *Food Environ Virol.* 2015 Dec;7(4):342-53. doi: 10.1007/s12560-015-9213-5. Epub 2015 Aug 13. PMID: 26267835.

Tort LF, Victoria M, Lizasoain A A, Castells M, Maya L, Gómez MM, Arreseigor E, López P, Cristina J, Leite JP, Colina R. Molecular epidemiology of group A rotavirus among children admitted to hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012: first detection of the emerging genotype G12.

J Med Virol. 2015 May;87(5):754-63. doi: 10.1002/jmv.24123. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25650154.(b)

Trudel-Ferland, M., Jubinville, E. & Jean, J. (2021) Persistence of hepatitis a virus RNA in water, on non-porous surfaces, and on blueberries. *Frontiers in Microbiology*, 4(12), 618352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.618352>

Tubatsi G, Kebaabetswe LP. Detection of Enteric Viruses from Wastewater and River Water in Botswana. *Food Environ Virol.* 2022 Jun;14 (2):157-169. doi: 10.1007/s12560-022-09513-4. Epub 2022 Feb 12. PMID: 35150381.

Tyler F Beck, James C Mullikin, the NISC Comparative Sequencing Program , Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants, *Clinical Chemistry*, Volume 62, Issue 4, 1 April 2016, Pages 647-654, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249623>.

Van Abel N, Schoen ME, Kissel JC, Meschke JS. Comparison of Risk Predicted by Multiple Norovirus Dose-Response Models and Implications for Quantitative Microbial Risk Assessment. *Risk Anal.* 2017 Feb;37(2):245-264. doi: 10.1111/risa.12616. Epub 2016 Jun 10. PMID: 27285380.

Varshney B, Jagannath MR, Vethanayagam RR, Kodhandharaman S, Jagannath HV, Gowda K, Singh DK, Rao CD. Prevalence of, and antigenic variation in, serotype G10 rotaviruses and detection of serotype G3 strains in diarrheic calves: implication for the origin of G10P11 or P11 type reassortant asymptomatic strains in newborn children in India. *Arch. Virol* 2002;147:143-165.

Vasickova, P., Pavlik, I., Verani, M. A. R. C. O., & Carducci, A. N. N. A. L. A. U. R. A. (2010). Issues concerning survival of viruses on surfaces. *Food and Environmental Virology*, 2, 24-34.

Vergara GGRV, Rose JB, Gin KYH. Risk assessment of noroviruses and human adenoviruses in recreational surface waters. *Water Res.* 2016 Oct 15;103:276-282. doi: 10.1016/j.watres.2016.07.048. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27472908.

Victoria M, Tort LF, García M, Lizasoain A, Maya L, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol.* 2014 Jun;6(2):116-24. doi: 10.1007/s12560-014-9143-7. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24777819.

Victoria M, Tort LF, Lizasoain A, García M, Castells M, Berois M, Divizia M, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *J Appl Microbiol.* 2016 May;120(5):1427-35. doi: 10.1111/jam.13058. Epub 2016 Apr 4. PMID: 26784369.

Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2015 Feb;53(2):373-81. doi: 10.1128/JCM.01535-14. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24989606; PMCID: PMC4298492.

Vu D.L., A. Bosch, R.M. Pintó, S. Guix, Epidemiology of classic and novel human astrovirus: gastroenteritis and beyond, *Viruses* 9 (2) (2017) pii: E33, <https://doi.org/10.3390/v9020033> 18.

Wade TJ, Augustine SAJ, Griffin SM, Sams EA, Oshima KH, Egorov AI, Simmons KJ, Eason TN, Dufour AP. Asymptomatic norovirus infection associated with swimming at a tropical beach: A prospective cohort study. *PLoS One.* 2018 Mar 28;13(3):e0195056. doi: 10.1371/journal.pone.0195056. PMID: 29590196; PMCID: PMC5874074.

Wang LP, Zhou SX, Wang X, Lu QB, Shi LS, Ren X, Zhang HY, Wang YF, Lin SH, Zhang CH, Geng MJ, Zhang XA, Li J, Zhao SW, Yi ZG, Chen X, Yang ZS, Meng L, Wang XH, Liu YL, Cui AL, Lai SJ, Liu MY, Zhu YL, Xu WB, Chen Y, Wu JG, Yuan ZH, Li MF, Huang LY, Li ZJ, Liu W, Fang LQ, Jing HQ, Hay SI, Gao GF, Yang WZ; Chinese Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Etiology of Diarrhea Surveillance Study Team. Etiological, epidemiological, and clinical features of acute diarrhea in China. *Nat Commun*. 2021 Apr 29;12(1):2464. doi: 10.1038/s41467-021-22551-z. PMID: 33927201; PMCID: PMC8085116.

Wen L, Nakayama M, Yamanishi Y, Nishio O, Fang ZY, Nakagomi O, Araki K, Nishimura S, Hasegawa A, Müller WE, Ushijima H. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Arch Virol* 1997;142:1481-1489. [PubMed: 9267457].

Winder N, Gohar S, Muthana M. Norovirus: An Overview of Virology and Preventative Measures. *Viruses*. 2022 Dec 16;14(12):2811. doi: 10.3390/v14122811. PMID: 36560815; PMCID: PMC9781483.

WHO. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods. Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/ 08.17.

Wu L, Teng Z, Lin Q, Liu J, Wu H, Kuang X, Cui X, Wang W, Cui X, Yuan ZA, Zhang X, Xie Y. Epidemiology and Genetic Characterization of Classical Human Astrovirus Infection in Shanghai, 2015-2016. *Front Microbiol*. 2020 Sep 25;11:570541. doi: 10.3389/fmicb.2020.570541. PMID: 33101242; PMCID: PMC7546348.

Xia Z, Johansson ML, Gao Y, Zhang L, Haffner GD, MacIsaac HJ, Zhan A. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. *Ecol Evol*. 2018 Nov 14;8(23):11799-11807. doi: 10.1002/ece3.4636. PMID: 30598777; PMCID: PMC6303721.

Ye XY, Ming X, Zhang YL, Xiao WQ, Huang XN, Cao YG, Gu KD. 2012. Realtime PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. *Curr Microbiol* 65:244-253. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0152-1>.

Yu AT, Burnor E, Rabe A, Rutschmann S, Wolfe MK, Burmester J, Pan CY, Chen A, Guevara H, Morales C, Wadford DA, Boehm AB, Vugia DJ. Wastewater Surveillance for Norovirus, California, USA. *Emerg Infect Dis*. 2024 Nov;30(11):2438-2441. doi: 10.3201/eid3011.241001. PMID: 39447203; PMCID: PMC11521154.

Zamora-Figueroa A, Rosales RE, Fernández R, Ramírez V, Bastardo M, Farías A, Vizzi E. Detection and diversity of gastrointestinal viruses in wastewater from Caracas, Venezuela, 2021-2022. *Virology*. 2024 Jan;589:109913. doi: 10.1016/j.virol.2023.109913. Epub 2023 Oct 23. PMID: 37924728.

Zhang M, Fu M, Hu Q. Advances in Human Norovirus Vaccine Research. *Vaccines*. 2021; 9(7):732. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070732>

Zhang M, Ghosh S, Kumar M, Santiana M, Bleck CKE, Chaimongkol N, Altan-Bonnet N, Shuai D. Emerging Pathogenic Unit of Vesicle-Cloaked Murine Norovirus Clusters is Resistant to Environmental Stresses and UV254 Disinfection. *Environ Sci Technol*. 2021 May 4;55(9):6197-6205. doi: 10.1021/acs.est.1c01763. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33856208.

Zhao Y, Zhang H, Zhao J, Zhong Q, Jin JH, Zhang GZ. Evolution of infectious bronchitis virus in China over the past two decades. *J Gen Virol*. 2016 Jul;97(7):1566-1574. doi: 10.1099/jgv.0.000464. Epub 2016 Mar 23. PMID: 27008625; PMCID: PMC7079583.

Zheng X, Zhao K, Xue B, Deng Y, Xu X, Yan W, Rong C, Leung K, Wu JT, Leung GM, Peiris M, Poon LLM, Zhang T. Tracking diarrhea viruses and mpox virus using the wastewater surveillance network in Hong Kong. *Water Res.* 2024 May 15;255:121513. doi: 10.1016/j.watres.2024.121513. Epub 2024 Mar 24. PMID: 38555782.

Zhu Y, Oishi W, Maruo C, Bandara S, Lin M, Saito M, Kitajima M, Sano D. COVID-19 case prediction via wastewater surveillance in a low-prevalence urban community: a modeling approach. *J Water Health.* 2022 Feb;20(2):459-470. doi: 10.2166/wh.2022.183. PMID: 36366998.

Zhou X, Li Q, Shi Z, Lu W, Shu C, Zhu J, Wu Y. Assessing the prevalence of human enteric viruses in hospital wastewater to evaluate the effectiveness of wastewater treatment systems. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2025 Jan 1;289:117488. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.117488. Epub 2024 Dec 6. PMID: 39644571.

Zhuo R, Freedman SB, Xie J, Charlton C, Plitt S, Croxen MA, Li V, Tarr GAM, Lee B, Ali S, Chui L, Luong J, Pang X. Molecular epidemiology of rotavirus among children in Western Canada: Dynamic changes in genotype prevalence in four consecutive seasons. *J Med Virol.* 2023 Aug;95(8):e29028. doi: 10.1002/jmv.29028. PMID: 37573569.

Zulli A, Chan EMG, Boehm AB. Detection of Hepatovirus A (HAV) in wastewater indicates widespread national distribution and association with socioeconomic indicators of vulnerability. *mSphere.* 2024 Nov 21;9(11):e0064524. doi: 10.1128/msphere.00645-24. Epub 2024 Oct 30. PMID: 39475316; PMCID: PMC11580403.

Zweigart MR, Becker-Dreps S, Bucardo F, González F, Baric RS, Lindesmith LC. Serological Humoral Immunity Following Natural Infection of Children with High Burden Gastrointestinal Viruses. *Viruses.* 2021 Oct 9;13(10):2033. doi: 10.3390/v13102033. PMID: 34696463; PMCID: PMC8538683.