

# Informe final publicable de proyecto

## Diversidad genética de los virus gastroentéricos en aguas residuales y superficiales en la cuenca del Río Uruguay

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2017\_1\_136092

30/07/2021

**VICTORIA MONTERO, Matías** (Responsable Técnico - Científico)

**GAMAZO RUSNAC, Pablo** (Investigador)

**SALVO RODRÍGUEZ, Marcos Matías** (Investigador)

**COLINA MUÑOZ, Humberto Rodney** (Co-Responsable Técnico-Científico)

**LÓPEZ TORT, Luis Fernando** (Investigador)

**MIR DA SILVA, Daiana** (Investigador)

**PEREIRA MIAGOSTOVICH, Marize** (Investigador)

**RODRIGUEZ OSORIO, Nelida** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE (Institución Proponente) \\  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ - FUNDACIÓN OSWALDO CRUZ \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

## Resumen del proyecto

Los Rotavirus (RVA), Norovirus (NoV) y Astrovirus (HAstV) son virus gastroentéricos considerados como los principales virus responsables de las gastroenteritis en humanos en todo el mundo. Estos virus se transmiten a través de la ruta fecal oral y son excretados en la materia fecal de los individuos infectados. Llegan muchas veces a contaminar diferentes cuerpos de agua tales como ríos y lagos, a través del impacto de las aguas residuales. Este estudio determinó las diferentes estirpes virales de estos tres virus en aguas residuales del litoral oeste de Uruguay así como también la probabilidad de infección de las personas que utilizan las aguas del Río Uruguay en la zona del balneario Las Cañas (pesca y baño). En las aguas residuales los tres virus entéricos fueron identificados revelando su circulación y excreción en la población del litoral uruguayo. RVA presentó una baja diversidad génica reflejada en un único genotipo para ambos genes estudiados. Con respecto a NoV fue detectada una alta diversidad génica reflejada en la co-circulación de varios genotipos tanto en el Genogrupo I como en el Genogrupo II. Interesantemente para HAstV fueron identificados varios genotipos no solo para los HAstV emergentes sino también de los clásicos. Fue determinado 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 revelando el impacto de la transmisión hídrica de las gastroenteritis virales en Uruguay. 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 los ríos, reduciendo considerablemente el impacto de estos virus en la salud humana por su vehiculación hídrica como fue evidenciada a través del riesgo de infección por la utilización de las aguas superficiales.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Virología / Virología Ambiental**

**Palabras clave: virus gastroentéricos / diversidad genética / aguas ambientales /**

## Introducción

Los virus entéricos son 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. Estos virus se transmiten a través de la ruta fecal oral siendo excretados en la materia fecal de los individuos infectados, llegando muchas veces a contaminar diferentes cuerpos de agua tales como ríos y lagos, a través del impacto de las aguas residuales contaminadas con estos virus. Dentro de este grupo de virus encontramos a los Rotavirus (RVA), Norovirus (NoV) y Astrovirus (HAstV), los cuales son considerados los principales virus responsables de las gastroenteritis en humanos en todo el mundo (Estes & Greenberg 2013, Robilotti et al. 2015, Vu et al. 2017).

Como mencionado anteriormente la transmisión de estos virus entéricos es a través de la ruta fecal oral por medio del contacto directo con un individuo infectado, por el contacto directo con superficies u objetos contaminados o por el consumo de alimentos o aguas contaminadas. Esta transmisión en todos los casos es muy eficiente ya que estos virus frecuentemente son excretados en altas concentraciones (llegando a 10<sup>11</sup> partículas virales por gramo de materia fecal) en las heces de las personas infectadas, persisten por largos períodos de tiempo en el ambiente y presentan una baja dosis infectiva (Atmar et al. 2014). Estos virus presentes en las heces forman parte de las aguas residuales que eventualmente pueden contaminar diferentes cuerpos de aguas que son destinados a la recreación, regadío de plantaciones o agua de consumo. Varios estudios han realizado una vigilancia ambiental de estos virus en las aguas residuales como una forma efectiva de obtener información de la epidemiología molecular de los virus circulantes en la población servida por la red de saneamiento así como también puede ser un método útil para la detección incipiente de brotes de estos virus y proveer una alerta temprana antes de que estos virus sean registrados en los pacientes de las instituciones de salud (Barril et al. 2010, Hellmer et al. 2014, Prevost et al. 2015a, Tort et al. 2015a).

Existen numerosos estudios en el mundo que demuestran la presencia de estos virus entéricos en elevadas frecuencias en diferentes cuerpos de aguas principalmente en aquellos localizados en regiones urbanas tales como ríos, riachuelos y lagos, principalmente en los países en desarrollo. Considerando exclusivamente las aguas residuales, estos virus han sido detectados hace ya más de 30 años por metodologías clásicas de virología y a partir de los 2000 las técnicas moleculares han sido ampliamente utilizadas tanto para su detección, cuantificación así como también para el estudio de los diferentes genotipos y variantes virales que circulan en esta matriz con el objetivo de obtener una imagen de la situación de la circulación de las variantes en la población local así como también determinar el impacto de la contaminación de los diferentes cuerpos de agua. 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 diferentes de diferentes genotipos en constante co-circulación (da Silva et al. 2016, Victoria et al. 2016).

Con el avance de las metodologías moleculares que nos permiten no solo detectar sino también cuantificar las partículas virales presentes tanto en muestras clínicas como en las diferentes matrices ambientales es posible evaluar los riesgos a la salud asociados a la exposición a ciertos virus entéricos en determinados cuerpos de agua que son utilizados con un determinado fin, como por ejemplo las aguas superficiales para recreación. 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 ha determinado el riesgo de infección de varios virus entéricos en diferentes 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).

En la última década hemos observado una explosión en la tecnología concerniente a la nueva generación de secuenciación (Next Generation Sequencing- NGS) donde encontramos diferentes metodologías que nos permiten obtener un profundo conocimiento de la diversidad viral presente en una determinada muestra (Hjelmsø et al. 2017). Si bien con las técnicas moleculares clásicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) seguida de secuenciación por la metodología de Sanger se ha observado la presencia de varias estirpes virales de diferentes virus en una misma muestra, el surgimiento de la NGS ha permitido obtener una visión mucho más profunda con lo que respecta a la diversidad de virus entéricos en las aguas residuales (Ogorzaly et al. 2015, Prevost et al. 2015b, Furtak et al. 2016).

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).

Vale destacar que hasta el momento de la realización de este proyecto no existía ningún estudio de la diversidad genética utilizando la tecnología de NGS para los virus estudiados. Con respecto al estudio de QMRA, nuestro grupo realizó recientemente un estudio donde se determinó el riesgo determinístico por QMRA de RVA in las aguas de los ríos Santa Lucía y Uruguay (Bortagaray et al., 2020), sin embargo no se ha realizado ningún estudio probabilístico por QMRA en Uruguay con estos tres virus entéricos.

Este estudio se abordó planteándose inicialmente una colecta mensual de muestras de aguas residuales y aguas superficiales durante un período de un año. Los virus entéricos fueron detectados y cuantificados por medio de la técnica de PCR en tiempo real y posteriormente se procedió a realizar la secuenciación por NGS y Sanger a partir de los amplicones obtenidos por PCR cualitativa. De esta manera se determinaron las estirpes virales presentes en estas aguas ambientales. En forma paralela se determinaron los riesgos de infección de RVA, NoV y HAstV para las personas que utilizan las aguas superficiales del balneario Las Cañas por medio de la metodología probabilística de QMRA utilizando los valores cuantitativos de la PCR en tiempo real.

Los resultados esperados al inicio del proyecto fueron los siguientes:

Se obtendrá un grupo 48 concentrados virales cada uno de ellos de 2 ml de las muestras de aguas residuales y 12 concentrados virales de las muestras de aguas superficiales, para los cuales se identificarán la presencia o ausencia de los mencionados virus, como punto de partida.

Se obtendrá una estirpe viral (por la metodología de Sanger) de cada virus (RVA, NoV y HAstV) en cada muestra positiva que será clasificada en un genotipo determinado por medio del análisis filogenético

Se obtendrá una amplia gama de variantes virales de diferentes genotipos (por la metodología de NGS) tanto de los Rotavirus, como de los Norovirus y Astrovirus humanos que será posible gracias a la robustez que tiene la tecnología de NGS en obtener la gran mayoría de las estirpes presentes en una determinada muestra.

Se determinará la probabilidad de infección para los individuos que utilizan las aguas recreacionales en el balneario Las Cañas para cada uno de los tres virus analizados.

Una alumna obtendrá su grado de Doctora en Ciencias Biológicas en el programa de pos grado del PEDECIBA por medio de la realización del presente proyecto.

## **Metodología/diseño del estudio**

A continuación, describiremos la estrategia y metodologías que fueron utilizadas para alcanzar cada uno de los objetivos específicos del proyecto.

Objetivo específico N° 1

Para realizar el monitoreo de RVA, NoV y HAstV se realizaron colectas mensuales durante un año tanto en aguas residuales como en aguas superficiales. Las colectas de las muestras de las aguas residuales comenzaron en marzo de 2017 en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos. También se realizó una colecta de agua superficial en el balneario Las Cañas, Fray Bentos (tres sitios), de forma mensual desde mayo de 2018 hasta abril de 2019. La concentración viral se realizó mediante el método de floculación orgánica (Calgua y colaboradores, 2008) para las aguas superficiales. Las aguas residuales fueron concentradas utilizando el método de ultracentrifugación (Pina et al., 1998).

Posteriormente realizamos la extracción de los ácidos nucleicos virales mediante el kit comercial QIAmp Cadour Pathogen Mini Kit (Qiagen®) y la transcripción reversa del ARN viral utilizando cebadores randómicos hexaméricos y la transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen™). En todos los procedimientos, se utilizó agua libre de nucleasas como control negativo y estirpes virales de genotipos conocidos para cada uno de los tres virus como control positivo.

La detección y cuantificación de RVA, NoV y HAstV se realizó por medio de las PCR cuantitativas (qPCR) como se describe a continuación. Estas qPCR para los tres virus se realizaron utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real con tecnología TaqMan®, con el kit SensiMix™ II Probe (BIOLINE Reagents Ltd) y el termociclador Rotor Gene Q (Qiagen®).

#### qPCR para HAstV

Los HAstV fueron detectados y cuantificados utilizando los cebadores AstVF y AstVR y la sonda TaqMan® FAM (Dai et al. 2010). Los cebadores AstVF y AstVR amplifican una región de 76 pb del ORF1b del genoma de los HAstV que codifica para la ARN polimerasa ARN dependiente.

#### qPCR para RVA

La detección/cuantificación de los RVA se realizó utilizando los cebadores NSP3F y NSP3R y la sonda NSP3S FAM (Zeng et al. 2008). Los cebadores NSP3F y R amplifican una región de 86 pb altamente conservada.

#### qPCR para NoV

Para la detección/cuantificación de los NoV se utilizaron los primers G1-F y G1-R y un juego de sondas fluorescentes VIC G1a y G1b, para la cuantificación de GI y los primers G2F/G2R y la sonda fluorescente FAM G2 para GII según lo descrito por Pang y colaboradores (2005). Los primers fueron diseñados para amplificar un fragmento de la región de unión del ORF1 y ORF2 que es la más conservada del genoma de los NoV.

#### Objetivo específico N° 2

La caracterización molecular se realizó por medio del análisis filogenético de las secuencias obtenidas por la metodología de Sanger a partir de los amplicones obtenidos por la PCR cualitativa de los genes informativos de los tres virus, detallada a continuación.

#### PCR para NoV

Se utilizaron dos semi-nested PCRs (GI y GII). Para GI se utilizaron los primers COG1F/G1SKR and G1SKF/G1SKR para el primer (380 pb) y segundo (330 pb) round, respectivamente. Para GII se utilizaron los primers COG2F/G2SKR y G2SKF/G2SKR para el primer (390 pb) y segundo (340 pb) round, respectivamente. Estos primers hibridizan en la región de la unión ORF1/ORF2 y la región 5' del ORF2 (cápside viral) (Kitajima et al. 2010).

#### PCR para HAstV

La detección de los HAstV emergentes se realizó con los cebadores SF0073 y SF0076 (RNA polimerasa viral) (Finkbeiner et al. 2009).

#### PCR para RVA

Se utilizaron dos nested PCR para los genotipos G y P de los genes VP7 y VP4, respectivamente (WHO, 2009). Los primers que se utilizaron en el primer round de las nested PCR para G y P respectivamente son 9con1/9con2 y 4con2/4con3. El segundo round contenía los primers internos VP7F/VP7Rdeg (881pb) para G y VP4F/VP4R (663pb) para P.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial AxyPrep™ DNA Gel Extraction (AXYGEN®).

Con las secuencias obtenidas se realizaron los análisis filogenéticos correspondientes. Para el ensamblaje y edición de las secuencias obtenidas se utilizó el programa Seqman®. Las secuencias de referencia de los diferentes genotipos fueron obtenidas de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y alineadas con las secuencias obtenidas a partir de nuestras muestras mediante la herramienta ClustalX. Los árboles se construyeron con el program IQtree utilizando un aLRT de 1000 réplicas mediante Máxima Verosimilitud. Los modelos evolutivos fueron: para VP4 y VP7 el modelo GTR+I+G. Para NoV GI y GII el TIM2e+I+G4 y SYM+I+G4, respectivamente. Para HAstV emergentes fue SYM+I+G4. Los análisis filogenéticos se visualizaron con el programa FigTree.

#### Objetivo específico N° 3

La caracterización de todas las estirpes virales, incluyendo las minoritarias (en aguas residuales) por medio de la utilización de la tecnología de Next Generation Sequencing 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 y HAstV está entre 400 y 550 bases.

Las bibliotecas se generaron mediante la utilización de los kit TrueSeq Nano DNA y Nextera DNA XT para los amplicones generados para NoV y HAstV y RV, respectivamente.

La primera etapa del pipeline aplicado en el análisis de NGS fue común para los tres virus analizados en el presente proyecto. Esta primera etapa de análisis consistió del 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 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. 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.

Las secuencias correspondientes a los haplotipos reconstruidos por CliqueSNV para RVA y los centroides mapeados de NoV y HAstV 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 SH-aLRT con 1000 réplicas. Los árboles filogenéticos se visualizaron utilizando el programa FigTree v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Este estudio se realizó en colaboración con las doctoras Nélida Rodríguez y Daiana Mir de la Unidad de Genómica y Bioinformática del Departamento de Ciencias Biológicas del CENUR Litoral Norte, Sede Salto, UdelaR.

#### Objetivo específico N° 4

A continuación se detallan los pasos planteados para realizar la evaluación del riesgo de infección (QMRA):

##### Identificación del riesgo.

Se plantearon dos escenarios posibles de riesgo de infección de los individuos que utilizan las aguas recreacionales.

Para el primero se estableció el QMRA para los niños y adultos que utilizan las aguas del Balneario Las Cañas en eventos de baño de inmersión y en el segundo se planteó la utilización de las aguas del Río Uruguay a la altura del Ex Frigorífico Anglo en Fray Bentos para pesca, considerando el riesgo a través del contacto directo agua mano boca de los pescadores que frecuentemente se encuentran en ese punto.

##### Evaluación de la exposición al riesgo.

En ambos escenarios se consideró la exposición a través de la ruta oral. Los parámetros determinados fueron los siguientes.

##### Baño de inmersión:

La dosis de virus ingerida en esta actividad fue calculada con la siguiente ecuación:

$$D = C \times 1/R \times \text{Tasa de Infectividad} \times IR \times t$$

C: concentración viral, R: tasa de recuperación viral, IR: tasa de ingestión por tiempo, t: duración de la exposición (asumida en una hora de baño).

La tasa de recuperación viral para RVA es de 33%, para NoV y HAstV es de 53% (Calgua et al., 2013).

Tasa de infectividad para RVA=0,000526 (Tim et al., 2016). NoV=0,054, esta misma tasa fue asumida para HAstV ya que en la literatura no existen registros de esta tasa (McBride et al., 2013).

El volumen ingerido por niños fue la media de la distribución uniforme entre 0 y 154 ml, el volumen ingerido por adultos

mayores de 18 años fue la media de la distribución uniforme entre 0 y 53 ml (Timm et al., 2016).

La probabilidad de infección para RVA fue calculada utilizando el modelo de Poisson según la siguiente ecuación:

$$P(N=N_50) = 1 - \sum_{k=0}^{N_50} \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$$

Donde  $N_50$  es la dosis infectiva media de 6,17, y el parámetro  $\lambda$  del modelo Poisson es de 0,253 (Chigor et al., 2014).

La probabilidad de infección para NoV y HAstV fue calculada utilizando el modelo 1F1 Hipergeométrica con los siguientes parámetros:

$$P(D=D) = 1 - \frac{1 - F1(D, N, D)}{1 - F1(N, N, -D)}$$

Donde  $N=0,04$  y  $D=0,055$  y  $D$  es la dosis de virus ingerida.

Vale resaltar que ambos modelos (Poisson y 1F1 Hipergeométrica) son específicos para cada virus y son utilizados indiferentemente del escenario planteado.

Pesca:

En este caso la dosis de virus ingerida en esta actividad fue calculada con la siguiente ecuación:

$$d = C \times 1/R \times \text{Tasa de Infectividad} \times \text{QHM}$$

La tasa de ingestión del contacto agua mano boca se determinó mediante la fórmula  $\text{QHM} = H \times A \times \text{fHM}$ , siendo  $H$  el film de agua en la mano ( $\text{cm}^2$ ),  $A$  es el área de piel de la mano que toca la boca ( $\text{cm}^2$ ) y  $\text{fHM}$  que es la frecuencia del contacto mano boca (número de contactos/hora) (Poma et al., 2019).

$H$  tiene una distribución uniforme entre  $1,97 \times 10^{-3}$  y  $2,34 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$  (USEPA 2011).

$A$  asume una distribución uniforme entre  $1 \text{ cm}^2$  y  $20 \text{ cm}^2$  (USEPA 2011).

$\text{fHM}$  asume una distribución gama con un  $\lambda=2$  y  $\mu=0,5$  (niños con media de 1,7 (0-5,6) veces por hora y en niñas con media de 2,3 (0-6,2) veces por hora). (Freeman et al., 2001).

Las probabilidades de infección se calcularon ajustando los datos a una distribución por núcleos o Kernell y para los valores de concentración que por qPCR dieron cero, se plantearon analizarlos en tres escenarios diferentes: el escenario 1 trató los ceros como ceros, el escenario 2 cambió los ceros por el límite de detección dividido 2 y en el escenario 3 se reemplazó los 0 por valores simulados con distribución uniforme entre 0 y el límite de detección.

Todos estos análisis se realizaron utilizando el programa R Studio®.

## Resultados, análisis y discusión

RVA fue detectado en las aguas residuales en un 50% del total de las muestras analizadas. NoV GI y GII fueron detectados en un 25% y 36%, respectivamente mientras que HAstV fue detectado en el 39% de las muestras analizadas (Tabla 1).

RVA fue detectado en las aguas superficiales en el 39% de las muestras analizadas, NoV GI no fue detectado, NoV GII fue detectado solamente en 2 muestras (6%) y HAstV en el 17% de las muestras analizadas. Vale resaltar que el punto del Frigorífico del Anglo probablemente fue el más impactado por RVA ya que ahí es el lugar de salida del agua residual de Fray Bentos al Río Uruguay (Tabla 2).

RVA en las aguas residuales presentó una media de concentración de  $6,6 \times 10^3 \text{ cg/L}$ , NoV GI y GII presentaron media de  $1,6 \times 10^6$  y  $6,6 \times 10^4 \text{ cg/L}$ , respectivamente y HAstV presentó una media de  $3,0 \times 10^4 \text{ cg/L}$  (Tabla 3).

En las aguas superficiales observamos para RVA una media de concentración viral de  $6,1 \times 10^3 \text{ cg/L}$ , NoV GI no fue detectado, para GII fue de  $2,3 \times 10^2 \text{ cg/L}$  y para HAstV fue de  $1,6 \times 10^4 \text{ cg/L}$  (Tabla 4).

Caracterización molecular utilizando la metodología de secuenciación por Sanger

Para la caracterización molecular por Sanger de Rotavirus utilizamos los genes VP4 y VP7. Para VP4 obtuvimos 2 amplicones que corresponden a la muestra A770 colectada en Salto en diciembre 2017 y la muestra A775 colectada en la ciudad de Salto en enero 2018. Ambas muestras se agrupan con secuencias de referencia del genotipo P8 y según el análisis filogenético agruparon con una muestra argentina detectada en 2009 (Figura 1).

Figura 1. Análisis filogenético para la región parcial del gen VP4 (663 pb) por secuenciación por Sanger. Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT y en rojo las muestras secuenciadas en este estudio (ver archivo de figura).

Los amplicones obtenidos para VP7 corresponden a las muestras A756 de Fray Bentos colectada en setiembre de 2017, la A742 de Fray Bentos de mayo de 2017 y la muestra A764 de la misma ciudad de agosto de 2017. Estas muestras obtenidas para VP7 corresponden al genotipo G3 (Figura 2). Se puede observar que nuestras muestras agrupan con muestras del genotipo G3 detectadas por nuestro grupo en aguas residuales de la ciudad de Salto en 2011 y en la ciudad de Melo en 2013.

Figura 2. Análisis filogenético para la región parcial del gen VP7 (881 pb) por secuenciación por Sanger. Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT y en rojo las muestras secuenciadas en este estudio (ver archivo

de figura).

En el análisis filogenético para NoV GI, la muestra A740 de mayo 2017 de la ciudad de Bella Unión agrupa con el genotipo 2. Las muestras A772 de enero 2018 y A778 de febrero 2018, ambas colectadas en la ciudad de Fray Bentos agrupan juntas en el clado del genotipo 5. La muestra A754 de agosto 2017 colectada en Fray Bentos mediante el análisis filogenético fue caracterizada como genotipo 6. Las muestras A735 de marzo 2017 de Salto y la A741 de setiembre del mismo año de Fray Bentos agrupan juntas en el clado de las genotipo 3 donde también se encuentra la muestra A756 de setiembre 2017 de la ciudad de Fray Bentos. Las muestras A760, A766, A770 de octubre, noviembre y diciembre 2017, respectivamente, todas de la ciudad de Salto, junto a la A764 de noviembre 2017 colectada en Fray Bentos agrupan dentro del clado del genotipo 7 (Figura 3).

Figura 3. Análisis filogenético para NoV GI de la región parcial de VP1 (380 pb) por secuenciación por Sanger. Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT y en rojo las muestras secuenciadas en este estudio (ver archivo de figura).

En la caracterización molecular de las estirpes virales de NoV GII se observa que la muestra A732 colectada en marzo 2017 en Fray Bentos, la A759 de setiembre 2017 de la ciudad de Bella Unión, A758 colectada en Salto en setiembre 2017, A761 colectada en la ciudad de Bella Unión en octubre 2017 y A736 colectada en Fray Bentos en abril del mismo año se clasifican como genotipo 2. La muestra A767 colectada en noviembre 2017 en la ciudad de Bella Unión corresponde al genotipo 5. Las muestras A745 de junio 2017 de Salto y la A766 de noviembre 2017 de la misma ciudad agrupan juntas dentro del clado del genotipo 6. Las muestras A777 de Salto correspondiente a febrero 2018, A778 del mismo mes de la ciudad de Fray Bentos, A771 colectada en diciembre 2017 en Bella Unión y A742 de la ciudad de Fray Bentos colectada en mayo 2017 en el árbol filogenético se encuentran dentro del clado del genotipo 4, agrupando con la variante Sydney 2012 (Figura 4).

Figura 4. Análisis filogenético para NoV GII de la región parcial de VP1 (390 pb) por secuenciación por Sanger. Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT y en rojo las muestras secuenciadas en este estudio (ver archivo de figura).

Con respecto a las estirpes secuenciadas de HAstV emergentes podemos observar en el análisis filogenético de la figura 5 que tres secuencias agruparon con el genotipo MLB1 con un buen soporte estadístico. Un hallazgo interesante fue que pudimos detectar una estirpe viral que si bien agrupa con los HAstV clásicos no pudo ser clasificado con ningún genotipo previamente definido.

Figura 5. Análisis filogenético para los HAstV emergentes realizado con la región de la ARN polimerasa (409 pb) por secuenciación por Sanger. Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT y en rojo las muestras secuenciadas en este estudio (ver archivo de figura).

#### Caracterización molecular por secuenciación masiva (NGS)

En la tabla 5 se observa el número de reads (VP7 y VP4 de RVA) obtenidos luego de los diferentes pasos de filtrado durante el análisis de secuencias para su posterior mapeo y genotipado por análisis filogenético. La muestra A770 (gen VP4) obtuvo luego de la secuenciación 580212 reads que luego de los diferentes filtrados se obtuvieron un total de 49583 reads. Esta muestra fue colectada en Salto (diciembre 2017), agrupa con el genotipo P8 (Figura 6) al igual que la muestra A775 de Salto enero 2018, que obtuvo luego del filtrado 29750 reads partiendo de 547242, se obtuvo 1 contig para cada muestra de VP4.

Figura 6. Análisis filogenético para la región parcial del gen VP4 (663 pb) por secuenciación por NGS (Illumina Miseq). Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT y en rojo las muestras secuenciadas en este estudio (ver archivo de figura).

Para el gen VP7, los amplicones obtenidos por NGS fueron de la muestra A742 colectada en mayo 2017 que luego del ensamblado de novo se obtuvo 1 contig, la A746 de junio 2017 de la cual se obtuvieron 2 contigs, la muestra A756 de setiembre 2017 de la cual se obtuvieron 2 contigs y la muestra A764 colectada en octubre 2017, todas de la ciudad de Fray Bentos, obteniéndose 3 contigs de esta última. Todos los contigs correspondientes a estas muestras fueron analizados filogenéticamente y se agruparon con el Genotipo G3, linaje III (Figura 7).

Figura 7. Análisis filogenético para la región parcial del gen VP7 (881 pb) por secuenciación por NGS (Illumina Miseq). Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT y en rojo las muestras secuenciadas en este estudio

(ver archivo de figura).

En la tabla 6 se observa la distribución de los reads obtenidos para NoV y HAstV en cada una de las etapas de su procesamiento. La muestra "NoV GII" contiene los amplicones de las muestras de marzo, abril y mayo de 2017 (aguas residuales). Se mapearon 11543 reads contra las secuencias de referencia. En la figura 8 observamos que la mayoría de las secuencias NoV GII agruparon con GII.2 (30 por NGS y 4 por Sanger) seguidas del genotipo GII.4 variante Sidney 2012 (16 por NGS y 4 por Sanger) y GII.6 (2 por Sanger).

Con respecto al análisis de NGS de HAstV, en la tabla 6 observamos dos muestras, la muestra HAstV i-p-v contiene amplicones de muestras procedentes de las estaciones de invierno, primavera y verano mientras que la muestra AstV o contiene amplicon solo de otoño. En el caso de AstV i-p-v se generaron 4503 reads que fueron utilizados para generar 10 centroides (OTUs) utilizados en el análisis filogenético. Para la muestra HAstV se utilizaron 9798 reads que generaron 17 OTUs utilizadas en el árbol filogenético. Se detectaron tres genotipos diferentes siendo el MLB1 el más frecuente (3 por Sanger, 8 NGS de otoño y 5 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 HAstV clásicos no fue posible su definición en un genotipo existente (Figura 9).

Figura 8. Análisis filogenético para NoV GII de la región parcial de VP1 (390 pb) por secuenciación por Sanger y NGS (Illumina MiSeq). Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT, en rojo las muestras secuenciadas por Sanger y en verde por NGS (ver archivo de figura).

Figura 9. Análisis filogenético de HAstV emergentes de la región parcial de la ARN polimerasa (409 pb) por secuenciación por Sanger y NGS (Illumina MiSeq). Se observa el soporte estadístico en cada rama por el valor de aLRT, en rojo las muestras secuenciadas por Sanger y en verde y azul por NGS (ver archivo de figura).

#### Análisis cuantitativo del riesgo microbiológico (QMRA)

La probabilidad de infección de RVA para las personas que utilizan con fines recreativos (pesca) las aguas en el punto del Frigorífico del Anglo ya sea en el escenario 1, 2 o 3, tiene una distribución que se encuentra entre 0 y 65%. Sin embargo, el cuantil 95% de la distribución de probabilidad de infección varió de 0% a 45%. Para el Balneario Las Cañas, la probabilidad de infección para los menores de 18 años que se bañan allí está entre 0 y 50% mientras que para los mayores de 18 años la probabilidad de infección en dicho punto se encuentra entre 0 y 38%, ambas probabilidades en cualquiera de los tres escenarios. El cuantil 95% para menores de 18 años fue de 0% a 45%, mientras que este cuantil fue de 0% a 31% para los mayores de 18 años (Figura 10).

Figura 10. Análisis cuantitativo del riesgo microbiológico de RVA según el sitio de colecta y actividad y el tratamiento de los valores no detectados (ver archivo de figura).

En la figura 11 se observa una distribución de probabilidad de infección para HAstV similar independiente del tratamiento de los valores no determinados. La probabilidad de infección para la actividad de pesca en el punto del frigorífico del Anglo varió de 0% a 45%, con un cuantil al 95% de 0% a 17%. Con respecto a la actividad de baño de personas mayores de 18 años, presentan una probabilidad de infección de 0 a 18% y un cuantil 95% de 0% a 5%. Las personas menores de 18 años presentaron una probabilidad mayor de 0 a 38% con un cuantil 95% de 0% a 14%.

Figura 11. Análisis cuantitativo del riesgo microbiológico de HAstV según el sitio de colecta y actividad y el tratamiento de los valores no detectados (ver archivo de figura).

Las probabilidades de infección para NoV se calcularon puntualmente (análisis determinístico):

La probabilidad de infección por NoV para la actividad de pesca para menores de 18 años fue de 50% y para mayores de 18 años fue de 48%.

La probabilidad de infección por NoV para la actividad de baño en el balneario Las Cañas para menores de 18 años fue de 51% y para mayores fue de 49%.

#### Conclusiones y recomendaciones

? Se pudo caracterizar genéticamente los tres virus estudiados tanto por secuenciación Sanger como por NGS.

? En las aguas residuales los tres virus entéricos fueron identificados revelando su circulación y excreción en la población del litoral uruguayo.



? Para RVA fue evidenciada una baja diversidad génica reflejada en un único genotipo para ambos genes estudiados y ambas metodologías empleadas (Sanger y NGS).

? Con respecto a NoV fue detectada una alta diversidad génica ya que detectamos la co-circulación de varios genotipos tanto en el Genogrupo I como en el Genogrupo II.

? Para HAstV interesantemente fueron identificados varios genotipos no solo de los HAstV emergentes sino también de los 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 y determinístico para NoV 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 revelando el impacto de la transmisión hídrica de las gastroenteritis virales en Uruguay, en especial en la población menor de 18 años de edad.

? Este es el primer trabajo realizado en Uruguay donde se determinó la diversidad génica de estos tres virus entéricos por la tecnología de Secuenciación Profunda (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.

? Este proyecto tiene una fortaleza importante con respecto al trabajo interdisciplinario ya que involucró tanto a biólogos, ingenieros y matemáticos generando resultados ampliamente 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.

? Como recomendación, 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 como fue evidenciada a través del riesgo de infección por la utilización de las aguas superficiales.

## Referencias bibliográficas

- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H. et al. (2014) Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis* 209, 1016–1022.
- 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.
- 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.
- 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.
- Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, López-Pila JM, Girones R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods*. 2008 Nov;153(2):79-83.
- Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods*. 2013 Feb;187(2):215-21. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.10.012. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23164995.
- 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.
- Dai YC, Xu QH, Wu XB, Hu GF, Tang YL, Li JD, Chen Q, Nie J. Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Arch Virol*. 2010 Jun;155(6):977-82.
- da Silva, M., Miagostovich, M. and 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
- Estes, M., & Greenberg, H. (2013). Rotaviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, et al. (Eds.), *Fields virology* (6th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer business/Lippincott Williams and Wilkins.
- 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.
- 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. *Virol J*. 2009 Oct 8;6:161.
- Freeman, N.C.G., Jimenez, M., Reed, K.J., Gurunathan, S., Edwards, R.D., Roy, A., Adgate, J.L., Pellizzari, E.D., Quackenboss, J., Sexton, K., Liroy, P.J., 2001. Quantitative analysis of children's microactivity patterns: the Minnesota children's pesticide exposure Study. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol*. 11 (6), 501e509.
- Furtak V, Roivainen M, Mirochnichenko O, Zagorodnyaya T, Laassri M, Zaidi SZ, Rehman L, Alam MM, Chizhikov V, Chumakov K. Environmental surveillance of viruses by tangential flow filtration and metagenomic reconstruction. *Euro Surveill*. 2016 Apr 14;21(15). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30193.

- Hellmer, M., Paxeus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergström, T. and Norder, H. (2014) Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 80, 6771–6781.
- 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.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin 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: PMC5453245.
- 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.
- 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
- Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011 Aug;156(8):1397-413. doi: 10.1007/s00705-011-1006-z. Epub 2011 May 20. PMID: 21597953; PMCID: PMC3398998.
- 
- McBride GB, Stott R, Miller W, Bambic D, Wuertz S. Discharge-based QMRA for estimation of public health risks from exposure to stormwater-borne pathogens in recreational waters in the United States. *Water Res*. 2013 Sep 15;47(14):5282-97. doi: 10.1016/j.watres.2013.06.001. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23863377.
- Ogorzaly L, Walczak C, Galloux M, Etienne S, Gassilloud B, Cauchie HM. Human Adenovirus Diversity in Water Samples Using a Next-Generation Amplicon Sequencing Approach. *Food Environ Virol*. 2015 Apr 28.
- Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol*. 2005 Jun;33(2):168-71.
- 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
- Prevost B, Lucas FS, Ambert-Balay K, Pothier P, Moulin L, Wurtzer S. Deciphering the Diversities of Astroviruses and Noroviruses in Wastewater Treatment Plant Effluents by a High-Throughput Sequencing Method. *Appl Environ Microbiol*. 2015b Oct;81(20):7215-22. doi: 10.1128/AEM.02076-15.
- Prevost B, Lucas FS, Goncalves A, Richard F, Moulin L, Wurtzer S. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environ Int*. 2015a Jun;79:42-50. doi: 10.1016/j.envint.2015.03.004
- 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.
- 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.

- 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. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016 Oct 18;4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584. PMID: 27781170; PMCID: PMC5075697.
- Timm C, Luther S, Jurzik L, Hamza IA, Kistemann T. Applying QMRA and DALY to assess health risks from river bathing. *Int J Hyg Environ Health.* 2016 Oct;219(7 Pt B):681-692. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.07.017. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27590614.
- 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.* 2015b May;87(5):754-63. doi:10.1002/jmv.24123.
- 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.* 2015a Dec;7(4):342-53. doi: 10.1007/s12560-015-9213- 5.
- Unites States Environmental Protection Agency (USEPA), 2011. Exposure Factors Handbook, 2011 ed. EPA/600/R- 09/052F.
- Vergara GG, Rose JB, Gin KY. Risk assessment of noroviruses and human adenoviruses in recreational surface waters. *Water Res.* 2016 Oct 15;103:276-82. doi: 10.1016/j.watres.2016.07.048
- 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.
- 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
- Vu DL, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. *Viruses.* 2017 Feb 18;9(2). pii: E33. doi: 10.3390/v9020033.
- WHO. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods. Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/ 08.17.
- Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008 Nov;153(2):238-40.

## Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)