



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Detección y caracterización de virus emergentes en su ciclo ambiental

Albert Blanco Ortiz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de Doctorado de Biotecnología
Departamento de Genética, Microbiología y Estadística
Facultad de Biología

Detección y caracterización de virus emergentes en su ciclo ambiental

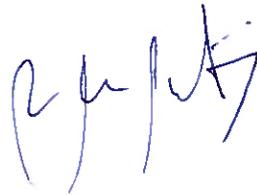
Memoria presentada por Albert Blanco Ortiz para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Barcelona

Director y tutor



Dr. Albert Bosch Navarro

Directora



Dra. Rosa Maria Pintó Solé

Doctorando



Albert Blanco Ortiz
Barcelona, 2021

El momento de escribir las dedicatorias es a la vez una de las partes más bonitas de la escritura, pero a mi parecer también es la más difícil. La vida está llena de encuentros y cada uno de ellos han contribuido en mayor o menor medida a que esta tesis se haga realidad. Es por ello por lo que, de antemano, me gustaría que la gente cuyo nombre o apodo no se mencione aquí no se lo tome a mal; cada día tengo peor memoria para los nombres, ¡y ésta nunca fue buena!

Mi primer agradecimiento va hacia mi familia, quienes han estado siempre aquí para apoyarme. A mi madre, que pese a todas las dificultades ha conseguido llevarnos adelante. A mi padre, quien, aunque siempre fue una persona poco dada a mostrar lo que sentía, pero que dentro suyo ha celebrado cada éxito y lamentado cada traspie. Mi hermana, tan segura de sí misma, tan valiente en la toma de decisiones... tan distinta a mí, en general. La forma en la que sobrelleva los problemas ha sido una gran fuente de inspiración. Mi cuñado, al que he conocido desde mi infancia y con el que congenio estupendamente pese a los gustos opuestos que tenemos. Y su padre, Jose, que siempre nos ha tenido en cuenta como uno más. Dentro de la familia más directa he de destacar a Keyla, quien llegó recientemente, pero en seguida nos olvidamos de cómo era la vida sin ella. Siempre que estoy contigo acabo agotado, ¡pero eres una de las alegrías de mi día a día!

También debo mencionar a varios de mis primos por parte de padre - Valen, Isa, Miguel Ángel, Francisco José, Soraya, Javier, Javi... -. Sé que no soy la persona más sociable del mundo, pero bien que me habéis aguantado todos estos años y me habéis sacado más de una sonrisa - ¡y algunos de vosotros quebraderos de cabeza! -. De mi familia por parte de madre quiero darles las gracias a mis tíos Paco y María, que solo han tenido palabras amables para mí. También está mi prima Tati, casi una hermana, con la cual he disfrutado cada una de las comidas en las que ha estado. No puedo olvidarme de mi tía Lorenza, que a mis 29 tacos

me ha seguido consintiendo. Tampoco puedo obviar a su hijo Francisco, mi padrino, siempre dispuesto a echar una mano en lo que hiciera falta.

Ningún viaje está completo sin mentores, y entre todos los profesores que he tenido a lo largo de mi etapa de estudiante hasta llegar a la universidad querría destacar a Pili, Pilar, Mónica, Josep, Yolanda, Alicia, Pere, Enric, Elena y Rosa Maria. Todos vosotros habéis contribuido a esta hazaña, ya sea inculcándome valores o manteniendo viva la llama de la ciencia y el pensamiento crítico, que más de una vez ha peligrado por apagarse.

A Agus, Selena, Eva, Audrey, Mario, Tere, Jessica y Elena, mis mejores amigos de la universidad. Ardo en deseos de poder quedar de nuevo como hacíamos antes, hablando de nuestras paranoias y que lo más productivo de las quedadas era engordar – para algunos. No te estoy mirando a ti, Selena. Para nada.

A mis compañeros de aventuras; Joan y Pablo, pero también a David, Carlos, Ciprian y Rubén. A vosotros cuatro os conocí en profundidad gracias a una charla por WhatsApp con Joan y a que tenía ganas de sufrir en su día zambulléndome en la saga Fate sin tener ni idea, pero pese a que nos conocemos desde hace poco menos de dos años me habéis regalado momentos inolvidables y espero que siga siendo así por mucho tiempo. En cuanto a ti, Pablo, nunca dejaré de esperar con ganas cada partida de God Eater por muchas sesiones que hagamos. ¿Qué llegará antes, los créditos en nuestra partida de God Eater 2 o el anuncio de un God Eater 4?

A Lorenzo, Oinebu, Enric y Sebastià, mis Chaldea Boys. Compartimos sesiones de charla en Discord a diario y ya sabéis qué pienso de vosotros, pero aun así quiero ponerlo; no cambiéis nunca. Las sesiones de Genshin, Monster Hunter y un largo etcétera no serían lo mismo sin vosotros. Cada domingo por la tarde me dais la vida. También debo mencionar a Patri, quien ya no está, pero ha dejado

una marca indeleble en las vidas de quienes la han conocido con su humor y su forma de entender el mundo.

Evidentemente también hay mucha gente que está o ha pasado por el grupo que debe ser mencionada. Primeramente, Nerea y Cristina, quienes llevaron mi TFM al comienzo y me instruyeron hasta el punto de hacer posible esta tesis. A todos mis compañeros del lab; Anna, Montse, Fran, Lucía, Aurora, Diem-Lan y Edu. Con todos vosotros he compartido risas, penas y miedos, he recibido de vosotros ánimos y consejos, y hemos hecho piña cuando alguno de nosotros estábamos en horas bajas. No me olvido ni de los nuevos ni de los estudiantes de Prácticum, TFG, TFM y las nuevas incorporaciones; Núria, Arnau, Gemma, Alba, Alexandra, Mario, Adán... Mucha suerte en todos vuestros proyectos. Y los colegas de otros grupos, muy en especial a Ale, Manu, Pedro, Geno y Sandra. Vuestro optimismo y perspectiva, las micropizzas y las cenas con vosotros han hecho del experimental mucho más llevadero y animado.

Finalmente, también quiero dar un profundo agradecimiento a mis directores, Albert y Rosa, y también a Susana. La experiencia en el campo de la virología de los tres, así como lo que hace único a cada uno de ellos - la confianza que Albert depositó en mí para aceptarme como estudiante cuando ninguno de vosotros me conocía, la personalidad enérgica y segura de Rosa, y los enfoques de Susana para sacar adelante proyectos que parecen haber llegado a un callejón sin salida - me resultaron apabullantes al comiendo, pero han sido imprescindibles para que poco a poco la tesis escrita más adelante haya tomado forma.

Abstract

Besides classic enteric viruses such hepatitis A virus and norovirus, there are other viruses that can reach water sources without being part of their transmission route. Some of these pathogens are enveloped viruses, which complicates their recovery with the usual concentration methods for the classic naked enteric viruses.

Glass wool filtration followed by polyethylene glycol (PEG) 6000 precipitation is cheap and reliable for recovering non-enveloped viruses, but is inefficient for the concentration of enveloped viruses. Thus, the first goal of this Thesis was the optimization of the glass wool filtration method for the recovery of enveloped viruses without losing efficiency for the recovery of naked viruses. Once optimized, this protocol was used to concentrate viruses from multiple water types such drinking water, surface water, well water, wastewater and brackish pond water.

The results presented suggest that the optimized glass wool filtration method is useful and reliable for recovering both enveloped and non-enveloped viruses. Of particular interest was the characterization of a norovirus outbreak of gastroenteritis associated to the consumption of bottled water. Remarkably, several emerging viruses, such as non-classical astroviruses, West Nile virus and rat coronaviruses, were detected in samples from Riyadh (Saudi Arabia), and Barcelona.

Additionally, a monthly surveillance of enterovirus in the Barcelona wastewater was implemented for the control of the circulation of highly pathogenic species such as Enterovirus A71 and D68. The dominant consensus sequence and the ensemble of major and minor sequences were determined by Sanger and deep sequencing, respectively.

Tabla de contenido

Abreviaturas.....	i
Unidades.....	iii
1 - INTRODUCCIÓN	1
1.1 - Historia y relevancia del tratamiento de aguas.....	3
1.2 - Los virus entéricos.....	5
1.2.1 - Virus entéricos enterotrópicos	6
1.2.2 - Virus entéricos hepatotrópicos	20
1.2.3 - Virus entéricos neurotrópicos: <i>Enterovirus</i>	38
1.3 - Emergencia de virus envueltos.....	47
2 - OBJETIVOS.....	53
3 - INFORME DE LOS ARTÍCULOS.....	57
3.1 - Artículos publicados y sus factores de impacto.....	59
3.2 -Informe de coautoría de los artículos publicados.....	61
3.3 -Informe de manuscritos pendientes de publicación.....	63
4 - PUBLICACIONES.....	67
4.1 - Capítulo I.....	69
4.2 - Capítulo II	75
4.3 - Capítulo III.....	87
4.4 - Capítulo IV	109
4.5 - Capítulo V	131
5 - DISCUSIÓN.....	149
6 - CONCLUSIONES.....	171
BIBLIOGRAFÍA	175

Abreviaturas

-ssRNA	RNA de cadena sencilla y polaridad negativa
+ssRNA	RNA de cadena sencilla y polaridad positiva
3'-UTR	Región no codificante 3'
5'-UTR	Región no codificante 5'
AdV	Adenovirus
Appr-1'-pase	ADP-ribosa-1'-monofosfatasa
AstV	Astrovirus
CoV	Coronavirus
CRE	Elemento cis-reactivo
C-ter	Extremo carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
EV	Enterovirus
HAstV	Astrovirus humano
HAV	Virus de la hepatitis A
HEV	Virus de la hepatitis E
HFMD	Enfermedad Mano-Pie-Boca
HuNoV	Norovirus humano
IFN- β	Interferón beta
IRES	Sitio Interno de Entrada del Ribosoma
MERS-CoV	Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio
MNoV	Norovirus murino
MVB	Cuerpos multivesiculares
NoV	Norovirus
mRNA	RNA mensajero

NSP	Proteína no estructural
N-ter	Extremo animo terminal
ORF	Marco de lectura abierta
PCP	Papain-like Cysteine Protease
PMA	Monoazida de propidio
PV	<i>Poliovirus</i>
RdRp	RNA polimerasa RNA dependiente
RNA	Ácido ribonucleico
RoV	Rotavirus
RV	Rhinovirus
SARS-CoV	Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
SaV	Sapovirus
SP	Proteína estructural
TGEV	Virus de la gastroenteritis transmisible porcina
tRNA	RNA de transferencia
VP1	Proteína de cápside mayor
VP2	Proteína de cápside menor
WNV	Virus del Nilo Occidental

Unidades

kb	kilobase
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
gc/g	copias genómicas por gramo
gc/L	copias genómicas por litro

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 – Historia y relevancia del tratamiento de aguas

El agua siempre ha sido una importante vía de transmisión de enfermedades, ya sean bacterianas, víricas o parasitarias, que hoy en día afecta sobre todo a los países en vías de desarrollo. Este problema ya se conocía desde el albor de las primeras civilizaciones, y el ser humano ha buscado métodos para evitar el contagio de aquellos patógenos que utilizan la vía fecal-oral. Cerca del 3500 a.C. se comenzó a hacer uso de letrinas en Mesopotamia para separar las aguas negras de aquellas destinadas al consumo [1]. Si avanzamos hasta el 2000 a.C. podemos observar que en el antiguo Egipto se utilizaba el cobre como método de desinfección de agua, siendo la primera de muchas culturas que darían a ese metal un uso en el saneamiento de agua de bebida [2]. Con el paso del tiempo aparecieron nuevos métodos de control y tratamiento de aguas con el propósito de prevenir enfermedades, basándose especialmente en la turbidez como parámetro de evaluación de la salubridad debido al desconocimiento de la existencia de los microorganismos hasta el siglo XVII. Aun así, no sería hasta después de las epidemias de cólera de 1854 y 1892 en Reino Unido y Alemania, respectivamente, cuando se comenzaron a instaurar las bases de la depuración de aguas con unas normativas que culminaron en el año 1897 y que supondrían la base de los métodos de saneamiento actuales [3]. Hoy día existe un sistema robusto y efectivo cuyos principios se cimientan en la gestión desarrollada por la antigua Grecia [1,4] que permite el fácil acceso de agua potable a la población.

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales y potabilización para el posterior uso y consumo están muy extendidos, pero todavía no se ha instaurado en todo el mundo. Los datos recogidos por WHO y UNICEF demuestran que en 2015 todavía el 7% de la población mundial carecía de acceso a una fuente de agua segura. La mayor parte de éstos son habitantes de países en vías de desarrollo donde además mucha gente no posee un sistema básico de

saneamiento y no pueden llevar a cabo prácticas básicas de higiene [5]. El escaso desarrollo socioeconómico de estas zonas hace que sea dificultosa la integración de un buen sistema de depuración y potabilización. Todo ello conlleva a una alta incidencia de las enfermedades transmitidas a través del agua, y junto con otros factores como la mala alimentación conllevan a una mayor gravedad de las mismas [3].

Determinar la carga microbiológica del agua para evaluar su calidad es algo bien establecido y relativamente fácil de llevar a cabo en nuestras instalaciones, pero el proceso se vuelve mucho más complejo y resulta poco viable en zonas económicamente deprimidas. La falta de infraestructuras y recursos limitan o incluso pueden llegar a impedir el uso de varios sistemas de detección de microorganismos. Esto es especialmente problemático en caso de querer determinar la presencia de virus ya que están generalmente en concentraciones demasiado bajas para ser eficientemente detectados de forma directa, por lo que se requieren grandes volúmenes de agua para poder hacer análisis válidos [6]. Todo método de detección de virus en muestras de agua precisa de un previo paso de concentración para acumular las partículas víricas en un volumen lo bastante pequeño para que su carga, en caso de hallarse en la muestra, exceda los límites de detección de las técnicas posteriores para así evitar falsos negativos. Eso supone un incremento en el coste del análisis que puede llegar a hacerse inasumible en según qué países. Este inconveniente también se puede hacer patente en laboratorios de ensayo de los países desarrollados cuando tienen que manipular un gran número de muestras [7].

Uno de los métodos más rentables a la hora de poder concentrar virus para su posterior análisis es la filtración por lana de vidrio, que permite poder procesar la muestra sin manipulaciones previas a la filtración y ya ha sido utilizada en diversas situaciones para la detección de virus en aguas, ya fueran residuales [8,9], crudas [10,11] o directamente destinadas al consumo humano

[7]. Todo ello, unido al bajo coste del proceso, hace de la filtración por lana de vidrio un método muy atractivo para concentrar muestras de una amplia variedad de sistemas hídricos y poder determinar la presencia de patógenos víricos en los mismos.

1.2 – Los virus entéricos

Se entiende por virus entérico todo aquel que puede encontrarse en el tracto entérico. Normalmente estos virus utilizan la vía fecal-oral para propagarse, lo cual implica que son susceptibles de ser transmitidos a través de agua o alimentos contaminados. Esa no es su única vía de contagio, pudiendo aprovechar también el contacto persona a persona cuando las condiciones higiénicas de la persona infectada no son óptimas [6]. La mayoría de virus entéricos tienen un genoma de ácido ribonucleico (RNA). El genoma de RNA les permite tener tasas de mutación del orden de 10^{-6} a 10^{-4} sustituciones por base y célula infectada, bastante por encima de los 10^{-8} - 10^{-6} de los virus con genomas codificados en ácido desoxirribonucleico (DNA). Eso, junto con la gran capacidad de recombinación y los altos títulos que excreta una persona infectada – llegando a las 10^{10} copias genómicas por gramo de hez (gc/gr) en algunos casos [6] –, ha hecho de estos virus patógenos de gran relevancia sanitaria aún a día de hoy [12].

Pese a que todos siguen la misma ruta de transmisión, los virus entéricos se pueden clasificar según su tropismo tras haber pasado la barrera intestinal en enterotrópicos, hepatotrópicos, neurotrópicos y pneumotrópicos [6]. La mayoría de infecciones entéricas están, no obstante, relacionadas con los dos primeros.

1.2.1 – Virus entéricos enterotrópicos

Las gastroenteritis constituyen una de las enfermedades más comunes en el mundo, con varios miles de millones de casos anuales registrados, de los cuales los principales agentes causales son los virus entéricos [13,14]. En Estados Unidos los casos de gastroenteritis aguda se contabilizan por encima de los 350 millones, y menos del 14% tienen un agente causal bacteriano [15]. El principal patógeno que causa gastroenteritis a nivel mundial es norovirus (NoV), responsable de 685 millones de casos anuales de gastroenteritis, representando por sí solo el 20% del total [12,16]. Su importancia relativa a nivel regional es variable; por ejemplo en la Unión Europea los mayores agentes causales de brotes a través de agua y alimentos son bacterianos [17], todo lo contrario a lo mencionado en Estados Unidos.

Además de NoV, hay descritos muchos otros virus entéricos que provocan gastroenteritis, siendo el caso de astrovirus (AstV), rotavirus (RoV), adenovirus (AdV) o sapovirus (SaV).

1.2.1.1 – Norovirus

NoV fue el primer representante de la familia *Caliciviridae* visualizado al microscopio electrónico, identificado gracias a un brote que hubo en Norwalk, Ohio, a finales de los años 60, de ahí el nombre que corresponde al primer genotipo descubierto [18]. Durante un tiempo el resto de los entonces denominados Small Round Structured Viruses (SRSV) fueron llamados *Norwalk-like virus* por su relación con el prototipo original. Se trata de un virus de cápside desnuda con simetría icosaédrica de aproximadamente 27 nm de diámetro, cuyo material genético está compuesto por una única cadena de RNA de cadena simple y polaridad positiva (+ssRNA) de aproximadamente 7.6 kb [19,20]. Dicho

genoma está poliadenilado en su extremo 3', contiene una proteína llamada VPg en el extremo 5'. Entre ellos hay tres marcos de lectura abiertos (ORFs) llamados ORF1, ORF2 y ORF3 que organizan todos los genes del virus (Figura 1). En el ORF1 se hallan únicamente las proteínas no estructurales (NSP) englobadas en una poliproteína que posteriormente se procesará por la proteasa NS6 codificada dentro de la misma, mientras que los otros dos ORF codifican para las proteínas estructurales (SP) que conforman la cápside, denominadas VP1 - o proteína de cápside mayor - y VP2 - o proteína de cápside menor [21-23].

Una de las características distintivas de la familia *Caliciviridae* es la formación de moléculas de RNA subgenómico durante su ciclo de infección. Dicha molécula posee las mismas características que el genoma completo en cuanto a modificaciones en sus extremos 5' y 3', pero solamente codifica para las proteínas estructurales. Éste es un mecanismo para incrementar la eficiencia de traducción de las proteínas de la cápside. En el caso de NoV su RNA subgenómico posee entre la VPg y el ácido poliadenílico tanto el ORF2 como el ORF3 (Figura 1) [21,22].

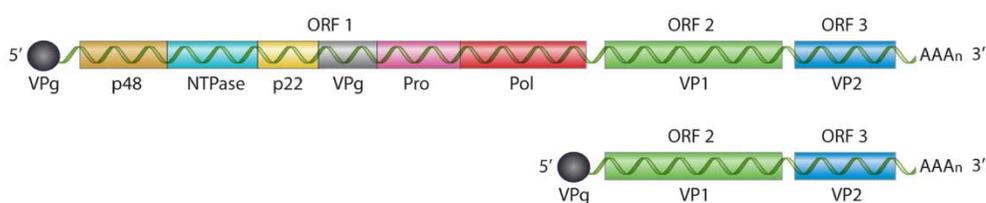


Figura 1. Organización del genoma de norovirus. El genoma completo del virus posee tres ORF que organizan las proteínas estructurales y no estructurales. ORF1 se traduce como una poliproteína que es procesada posteriormente por la proteasa (Pro) localizada dentro de la misma y que contiene además la RNA polimerasa RNA dependiente (Pol) así como proteínas necesarias para formar el complejo de replicación (p48 y p22), entre otras. ORF2 y ORF3 codifican para únicamente una proteína estructural cada una. Durante el ciclo, además, se puede observar la presencia de RNA subgenómico que solamente contiene los dos últimos ORF. Imagen adaptada de [23].

1.2.1.1.1 - Ciclo replicativo de norovirus

El estudio de los norovirus humanos (HNoV) se ha visto obstaculizado por los enormes problemas para cultivarlos y propagarlos en laboratorio [24], lo cual ha dificultado mucho la comprensión de su ciclo replicativo. Buena parte del conocimiento que se tiene de su ciclo es gracias al norovirus murino (MNoV), uno de los pocos norovirus que sí se ha conseguido replicar *in vitro* con un sistema robusto y reproducible. Anteriormente se extrapolaron los datos recogidos de otro miembro de la familia *Caliciviridae* que se encontraba fuera del género *Norovirus*, el calicivirus felino, con las limitaciones que ello comportaba al estar bastante alejado filogenéticamente y provocar, además, una enfermedad respiratoria en vez de entérica [25]. En los últimos años se ha descrito la posibilidad de propagar NoV utilizando enteroides derivados de células madre [26], lo cual permitirá comprender con mucho más detalle su ciclo biológico.

A pesar de todo, gracias al modelo de MNoV se tiene una aproximación de sus mecanismos de replicación. Todavía existen muchas incógnitas alrededor del ciclo de NoV, especialmente en lo que se refiere a las moléculas determinantes de su tropismo [27], pero está claro que, tras haber sido ingerido y haber pasado la primera barrera que supone el bajo pH estomacal, el virus halla su diana en el intestino. Diversos estudios apuntan a que entre los receptores utilizados por MNoV y posiblemente los genotipos que infectan a humanos se hallan las proteínas de membrana conocidas como CD300lf y CD300ld [28,29]. Éstas se encargan de la regulación de procesos intracelulares, haciendo de inhibidor y activador de procesos inmunológicos, respectivamente. Otras glicoproteínas y glicolípidos como los antígenos del grupo histosanguíneo (HBGA), así como el ácido siálico y la fucosil-transferasa 2 (FUT2) han mostrado tener también un papel en la interacción virus-célula de NoV [30-32].

Tras dicha interacción el virión completo entra en la célula por un mecanismo que a día de hoy todavía se desconoce. Una vez dentro, la cápside se

desnaturaliza para liberar el ácido nucleico. Al tratarse de un +ssRNA, actuaría igual que un RNA mensajero (mRNA) dentro de la célula y, mediante la VPg unida covalentemente al extremo 5', se recluta las proteínas implicadas en la traducción. Esto sucede ya que el virus utiliza la VPg como un sustituto de la proteína cap que normalmente está implicada en dicho proceso [21]. Una vez producida la poliproteína de ORF1, ésta se procesa gracias a la proteasa (Pro) codificada en la misma. Esta proteasa se encarga de liberar las distintas proteínas incluidas en la poliproteína tanto durante como después de su traducción. Con la poliproteína procesada se liberan los diversos factores víricos implicados en la replicación del genoma; p22, NTPasa, p48, la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) y VPg. La replicación está asociada a membranas provenientes del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Estos mecanismos de generación de membranas para su uso en la replicación es un proceso ampliamente observado en los virus +ssRNA [33]. En el caso concreto de NoV se ha visto la capacidad de la NPTasa de NoV de formar vesículas en el citoplasma, así como su localización en las membranas del retículo endoplasmático y las mitocondrias, pudiendo estar implicada en la formación de las vesículas donde se llevará a cabo la replicación [34]. De este papel se encargan también p22 y p48, cuyo papel es inhibir el tráfico de vesículas hacia el aparato de Golgi y de disgregar dicho orgánulo, respectivamente [21]. Tras el reclutamiento de membranas la RdRp inicia una síntesis conocida como *de novo* donde se produce una molécula de RNA de cadena negativa (-ssRNA) sin necesidad de VPg. Una vez sintetizado este molde, la misma polimerasa se encargará de la síntesis de genomas de NoV mediante un proceso dependiente de VPg, ya que ayudaría a la polimerasa a comenzar la replicación actuando a modo de primer. De esta manera se sintetizaría un nuevo RNA que serviría tanto para generar más poliproteína como para la replicación de nuevos genomas [35].

La generación del RNA subgenómico continúa siendo un proceso por clarificar, habiendo a día de hoy dos posibles modelos de cómo sucede su síntesis. Ambas, sin embargo, coinciden en una señalización localizada antes del inicio del ORF2, tomando como referencia el RNA genómico del virus. El primer modelo implica la formación de una estructura secundaria en el +ssRNA de NoV que actuaría a modo de señal para finalizar el -ssRNA una vez hecho el molde de únicamente los ORF2 y 3, teniendo así un molde del cual saldría únicamente el RNA subgenómico [36]. El segundo modelo sitúa la estructura secundaria en el -ssRNA, y en vez de ser un terminador haría de señal para reclutar VPg en esa zona. Así, con un único tipo de molde se podría sintetizar tanto el RNA genómico como el subgenómico. Este tipo de síntesis de RNA subgenómico se ha visto en otros miembros de la familia *Caliviridae* [37].

Terminada la replicación y mediante las copias de RNA subgenómico, el virus traduce la región correspondiente a las proteínas VP1 y VP2 para formar las cápsides. Se ha podido observar que VP1 es capaz de autoensamblarse sin necesidad de factores celulares, dando lugar a partículas indistinguibles del virión maduro en cuanto a forma y antigenicidad. Sin embargo, estas partículas ensambladas solamente a partir de VP1 no son infecciosas, con lo que en el proceso de ensamblaje se requiere también la presencia de VP2 para generar un virión maduro y funcional. Esto se debe a que probablemente VP2 esté involucrada en la encapsidación del ácido nucleico, si bien también se requiere una interacción entre VP1 y VPg para que dé lugar a la encapsidación, discriminando entre los mRNA de la célula y el genoma de NoV [21].

El mecanismo de salida de la célula todavía no se conoce con exactitud, pero se ha propuesto que el virus provoque la apoptosis celular para liberar los viriones. Esta teoría se ve reforzada con diversos estudios donde se ha detectado la acumulación de moléculas apoptóticas en las células infectadas, así como el hecho de haber detectado actividad proapoptótica en la NTPasa [34].

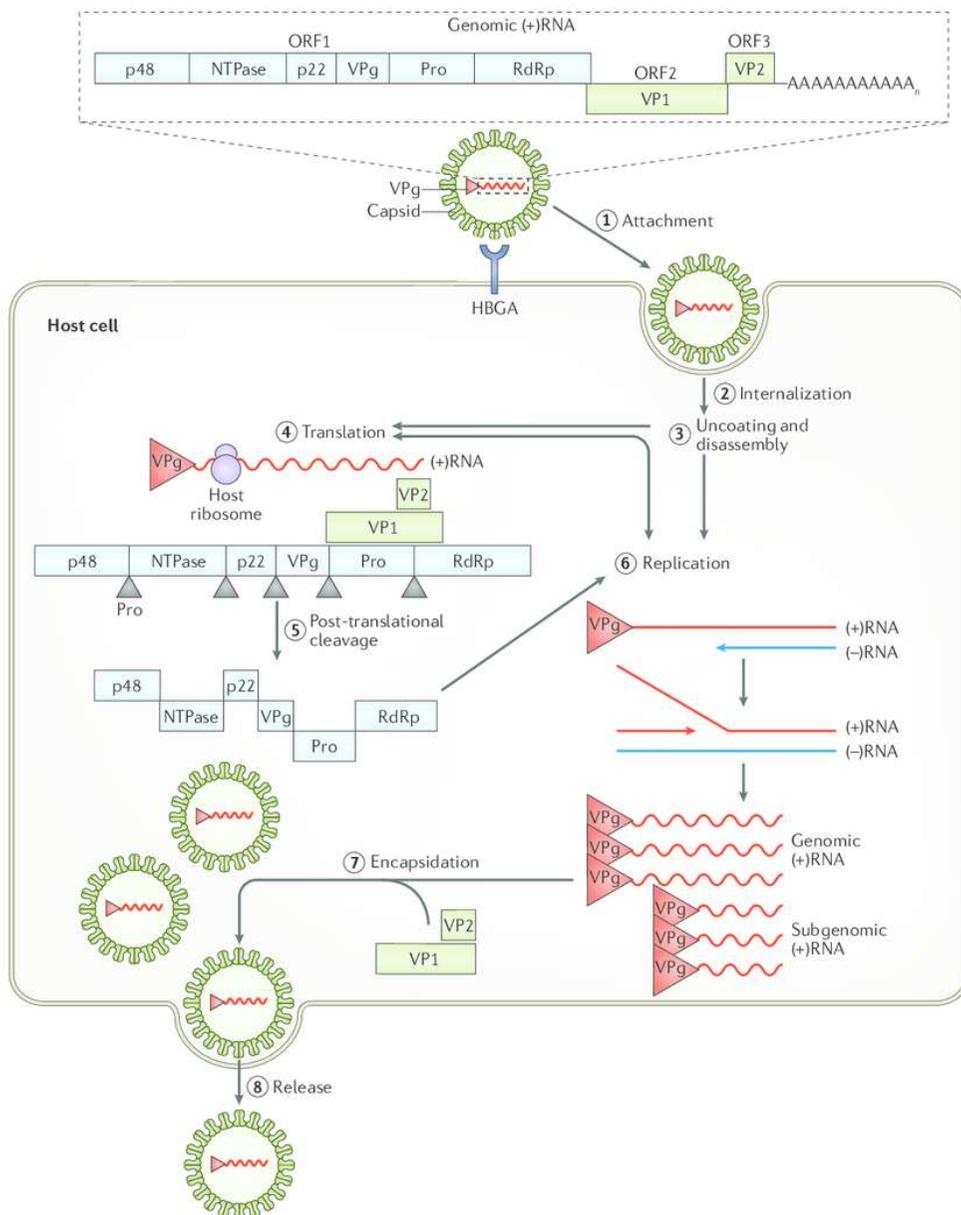


Figura 2. Esquema del proceso de multiplicación de NoV dentro de una célula infectada. Tras la internalización y desencapsidación del ácido nucleico, el virus produce la poliproteína cuyos componentes están destinados a la replicación. Cabe destacar la importancia de la presencia de VPg tanto en el RNA genómico como en el subgenómico, indispensable para el inicio de la polimerización de un nuevo RNA. Es éste RNA el encargado de producir a gran escala VP1 y VP2 para así encapsidar el RNA genómico y liberar los nuevos viriones. Imagen extraída de [32].

Una vez fuera de la célula, los viriones pueden iniciar un nuevo ciclo replicativo en las células vecinas o ser excretados en las heces y así eventualmente contaminar aguas o alimentos que harán de vía de transmisión hacia otros hospedadores.

1.2.1.1.2 – Filogenia y diversidad de norovirus

Los diferentes NoV se clasifican dentro del género según la secuencia de la proteína VP1 dando lugar a siete genogrupos que engloban los diferentes genotipos conocidos. Las secuencias de dos norovirus pertenecientes a dos genogrupos distintos pueden diferir más de un 50% entre ellos [32]. De todos ellos solamente los genogrupos I, II y IV – denominados comúnmente GI, GII y GIV – comprenden genotipos que infectan al ser humano [38–40]. La gran mayoría de infecciones por NoV son causadas por serotipos incluidos en el genogrupo II, y después por el genogrupo I y con mucha menor incidencia el genogrupo IV [38]. La gran diversidad y variabilidad de NoV, especialmente alta en los genogrupos I y II (Figura 3), es lo que le ha otorgado su gran eficiencia a la hora de infectar a la población, ya que se dan casos en todos los rangos de edad y muchas de las personas afectadas ya pasaron por gastroenteritis previas causadas por NoV. Las variantes de NoV GII.4 han sido hasta hace poco las cepas con mayor peso en la incidencia de gastroenteritis por norovirus en todo el mundo, aunque recientemente han aparecido cepas del genotipo GII.17 que han desplazado en número de casos a GII.4 [41–43].

Junto con las diferencias en secuencia y hospedadores, los genogrupos pueden diferir en otros aspectos como es el caso de su transmisión; mientras NoV GI es más frecuente en los brotes provocados por aguas, NoV GII está más relacionado con gastroenteritis cuya causa son los alimentos [44,45]. Los diversos genogrupos también pueden presentar diferencias en sus ciclos infecciosos. Por ejemplo, NoV GV, donde se encuentra MNV, posee una NS4 con menor

actividad de inhibición de procesos celulares que el análogo en los norovirus humanos, p22 [21].

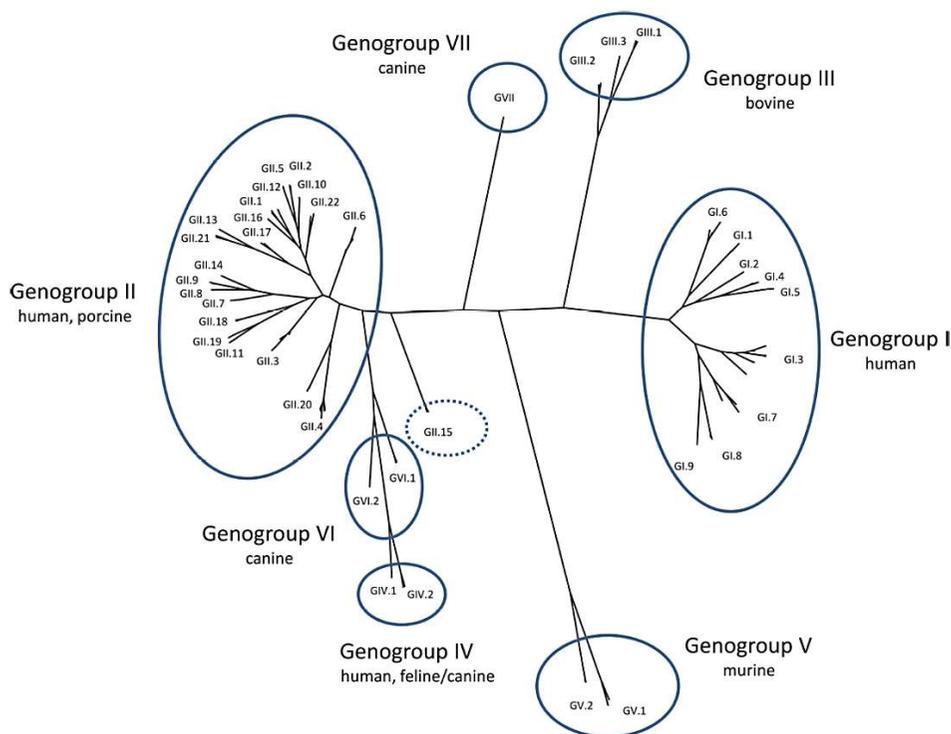


Figura 3. Árbol filogenético de norovirus. En él se pueden apreciar los siete genogrupos en los que están clasificados los diversos genotipos, así como el hecho de que la mayor parte de la diversidad recae en los genogrupos I y II. Imagen extraída y editada de [40].

1.2.1.1.3 - Epidemiología

Las infecciones de NoV ocurren durante todo el año, pero su frecuencia se ve incrementada en los meses fríos [46]. Éstas cursan generalmente con diarreas, náuseas, vómitos, y en unos casos más aislados también se añaden fiebre y dolor abdominal a la sintomatología. El cuadro clínico se manifiesta generalmente 48 horas después de la infección [18], aunque se han registrado brotes con períodos de incubación más breves así como más prolongados [47,48]. En personas con un sistema inmunológico sano la enfermedad es leve y autolimitante, superándose la infección pasadas entre 24 y 72 horas [49]. Se

pueden dar casos de enfermedades con un cuadro más severo, en el cual además de aumentar la proporción de enfermos con dolor abdominal y fiebre, esta última llega temperaturas más altas, así como aparecen otros síntomas como puede ser la rigidez de cuello. Cuando las personas infectadas tienen una salud comprometida, junto con la severidad aumenta también la duración del periodo sintomático [49-51]. En los colectivos con un sistema inmunológico más débil se puede dar incluso casos mortales [38,50].

En el polo opuesto encontramos las infecciones asintomáticas, donde la persona es capaz de excretar virus en las heces y propagarlo a pesar de no cursar con el cuadro clínico de la enfermedad. Hay una clara correlación entre la ausencia de síntomas y la edad, siendo los niños el colectivo más susceptible a contraer este tipo de infección, pudiendo llegar a ser casi el 50% del total de niños infectados en un brote [52]. Por el contrario, en NoV GII no se han encontrado diferencias entre la carga de virus excretada por personas que cursan con una infección asintomática y la de aquellos que sí manifiestan síntomas, lo cual convierte a los portadores asintomáticos en un importante e invisible foco de contagio [53]. Toda esta información relacionada con las infecciones asintomáticas hace que NoV continúe siendo un patógeno importante en todo el mundo cuya detección en el medio acuático es indicativa de la circulación del virus independientemente de la existencia de casos sintomáticos.

1.2.1.2 - Astrovirus

AstV es otro virus entérico causante de gastroenteritis que fue visualizado por primera vez en 1975. Su nombre hace referencia a la forma de los viriones, pues su cápside conforma una estructura que recuerda a una estrella [54]. Los viriones de AstV tienen un diámetro aproximado de 28 nm, llegando hasta los 41 nm cuando se tienen en cuenta sus picos característicos, y no poseen envuelta. La cápside de AstV tiene una simetría T=3, cuyos capsómeros están conformados por tres proteínas llamadas VP34, VP27 y VP25, todas provenientes del intermediario VP70 que a su vez deriva del precursor VP90 [55,56]. Mientras VP34 es la encargada de recubrir el material genético y posee el dominio más conservado, las otras dos proteínas forman la zona externa de la cápside y los picos característicos. Su genoma está formado por una única molécula de +ssRNA con una proteína VPg en su extremo 5' y poliadenilación en su extremo 3' y consta de una longitud que puede ir de las 6.2 a las 7.8 kb [57]. Éste consta de tres ORFs denominados ORF1a, ORF1b y ORF2. Los dos primeros codifican las NSP, y el último la VP90 que dará lugar a las tres SP comentadas anteriormente.

1.2.1.2.1 - Ciclo replicativo de astrovirus

Pese a que todavía se desconoce con qué moléculas interacciona AstV para adherirse a la célula e iniciar su entrada, las diferencias en el tropismo de los distintos serotipos de astrovirus apuntan a que no hay un único receptor involucrado [58]. Tras el reconocimiento se inicia la entrada del virus mediante una endocitosis mediada por clatrina [59] y una vez dentro la vesícula pasa por un proceso de maduración hasta que el genoma es liberado de un endosoma tardío. Ya en la célula, se inicia una traducción VPg dependiente [60-62] de dos poliproteínas llamadas nsP1a y nsP1ab, en función de si la traducción incluye solo el ORF1a o también traduce ORF1b. Todo esto se debe a un heptámero que

en caso de formar una estructura secundaria permitiría la fusión de ambos ORF en la traducción. No se ha descrito la síntesis de la RdRp de ORF1b de forma independiente [63]. Para que los componentes de dichas poliproteínas sean funcionales han de procesarse por proteasas tanto celulares como del virus [64]. Finalizado el procesamiento de las poliproteínas, se forma el complejo de replicación que dará lugar primeramente al –ssRNA molde y posteriormente a nuevas copias de RNA tanto genómico como subgenómico de AstV. Si bien no se ha descrito con precisión, es posible que las membranas que AstV utiliza para la replicación y el posterior ensamblaje deriven del retículo endoplasmático, ya que se han visualizado partículas de doble membrana englobando viriones que, además, se sitúan cerca del núcleo celular [61].

La mayor parte de la traducción del ORF2 ocurre principalmente gracias al RNA subgenómico. La proteína traducida, la ya mencionada VP90, reconocería el RNA genómico de AstV gracias a unos residuos que corresponderían a un fragmento de VP34 no esencial para la formación de la cápside [65]. Una vez formado el virión inmaduro, una serie de caspasas celulares procesan todas las VP90 que forman el virión de astrovirus, generándose un virión cuya cápside estaría formada por VP70. Estas caspasas podrían verse activadas gracias a la función proapoptótica de nsP1a [66]. Si bien ya tiene cierta infectividad, este virión todavía no se considera maduro, y requiere de la presencia de tripsina una vez ha salido de la célula para procesar las tres proteínas que conforman los capsómeros de un virión infeccioso; VP34, VP27 y VP25 [65].

La salida del virus depende del procesamiento de VP90 por las caspasas celulares. No se conoce cómo sale el virus de la célula, pero sí se ha detectado que puede salir tanto provocando lisis celular como prescindiendo de ella [67].

1.2.1.2.2 - Filogenia de Astrovirus; nuevos genotipos emergentes

El término astrovirus engloba a todos los virus de la familia *Astroviridae*, que incluye dos géneros, *Mamastrovirus* y *Avastrovirus* según si infectan a mamíferos o a aves, respectivamente [57]. Estos géneros se encuentran separados por genotipos dentro de los cuales se engloban diferentes serotipos de AstV que comparten hospedador. El único genotipo con más de un hospedador es el 2, englobando virus de gato y leopardo. Existen ocho serotipos de AstV estrechamente relacionados entre sí incluidos en el genotipo 1 de *Mamastrovirus* (MAstV-1); éstos corresponden a los comúnmente llamados astrovirus humanos (HAstV, por sus siglas en inglés), siendo considerados hasta 2008 los únicos AstV con este hospedador [55,68].

Actualmente se conocen otros tres genotipos de astrovirus que infectan a humanos; los genotipos 6, 8 y 9 (MAstV-6, MAstV-8 y MAstV-9, respectivamente). Éstos se encuentran filogenéticamente más relacionados con otros AstV animales que con el genotipo 1. Los nuevos genotipos incluyen los serotipos de astrovirus conocidos como MLB-1, MLB-2 y MLB-3 (MAstV-6), VA2 y 4 (MAstV-8) y finalmente VA1 y VA3 (MAstV-9). Algunos de estos nuevos serotipos tienen tropismos distintos a los anteriormente mencionados MAstV-1 a 8, ahora denominados astrovirus clásicos y se han aislado de pacientes con enfermedades que no son gastroenteritis, aunque acaban siendo igualmente excretados por las heces.

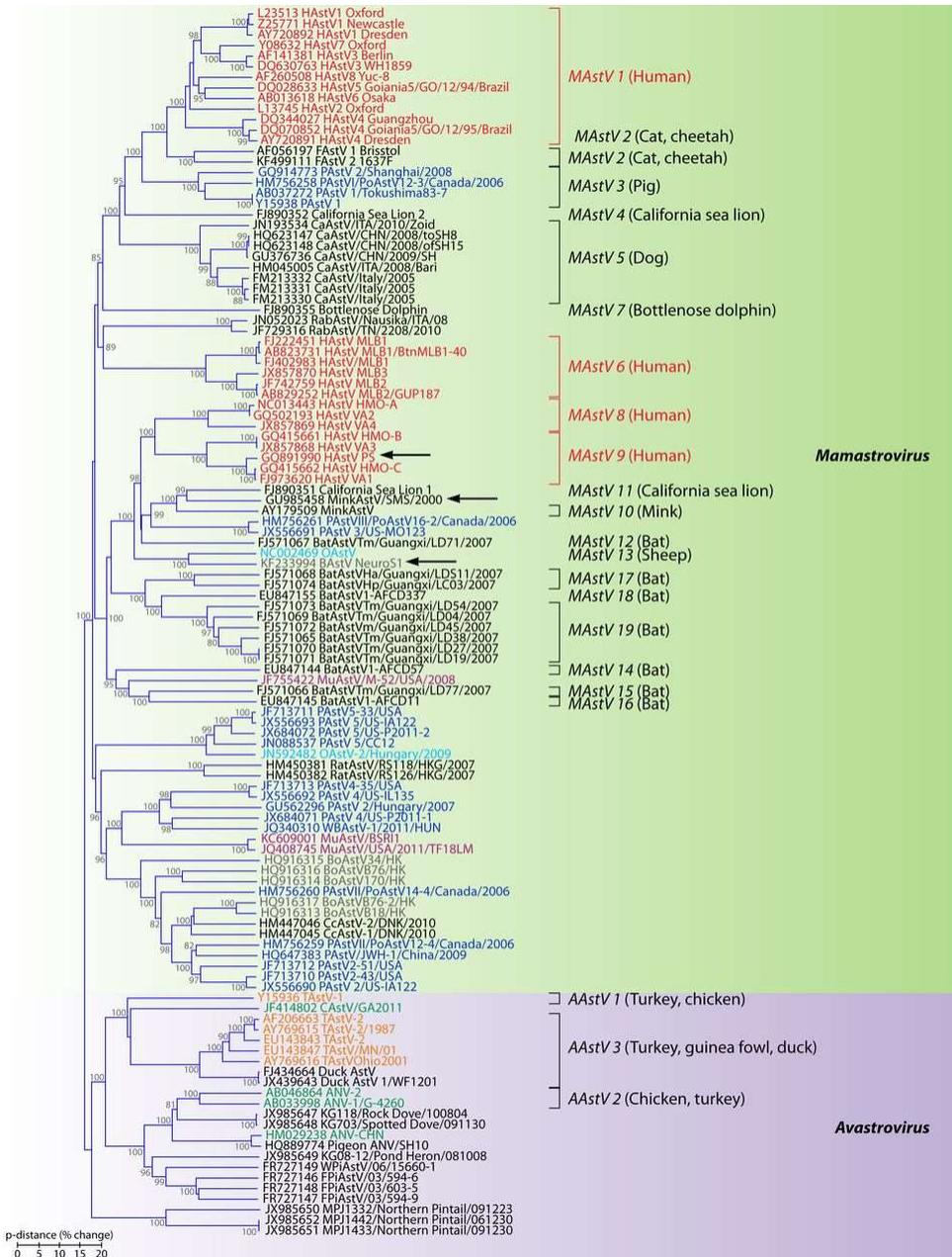


Figura 4.: Árbol filogenético de astrovirus. Los cuatro genotipos que infectan al ser humano están marcados en color rojo, pudiendo apreciarse la distancia que hay entre MAsV-1 (astrovirus humanos clásicos) de los MAsV-6, 8 y 9 (astrovirus humanos no clásicos). Imagen extraída de [57].

1.2.1.2.3 - Epidemiología

Se calcula que AstV es el causante de entre el 2 y el 9% de los casos de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial en niños [57] siendo con una incidencia máxima entre los dos y los cinco años, si bien también puede causar grandes brotes en adultos. La incidencia de infecciones por AstV tiene una clara estacionalidad que cambia dependiendo de la región; en el trópico se ve un aumento en el número de casos en la estación lluviosa, mientras que en las regiones templadas es en invierno cuando la incidencia alcanza su máximo [69,70].

Las gastroenteritis por AstV cursan con una enfermedad leve, siendo autolimitante en la mayor parte de los casos. Tras un período de incubación de entre 1 y 5 días aparecen los síntomas de la infección, que se solucionan pasado un rango de tiempo similar, durando en la mayor parte de casos entre 48 y 72 horas. Los síntomas más comunes son diarrea (tanto acuosa como mucosa), náusea, vómitos, fiebre y dolor abdominal [71,72]. Los vómitos, si bien se trata de un síntoma bastante común, son más infrecuentes que en las gastroenteritis causadas por otros agentes, como norovirus [72]. También se pueden dar casos de gastroenteritis con síntomas más peligrosos como la intususcepción o enterocolitis necrotizante [72,73], o un aumento de la severidad en la sintomatología habitual, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. En este último colectivo se pueden dar otros casos de enfermedades más graves causadas por AstV tales como meningitis, encefalitis e infecciones sistémicas, así como se ha detectado en enfermedades respiratorias pese a no haber determinado si era el agente causal de dicha infección [57,74-78]. La mayor parte de estos casos son normalmente causados por los astrovirus no clásicos.

Al igual que muchos otros virus entéricos, se sabe que se producen enfermedades asintomáticas, desconociéndose si hay diferencias en la excreción de virus entre aquellos que cursan con enfermedad y aquellos que no en la

mayoría de genotipos de AstV. Un estudio en la India no detectó diferencias significativas en la carga vírica entre casos sintomáticos y asintomáticos de una infección causada por MLB1 [79], lo que podría sugerir que en el resto de AstV también sería así. Haya diferencias o no, la presencia de infecciones que cursen sin manifestaciones clínicas dificulta en gran medida el control de la propagación de AstV, siendo especialmente problemático en el caso de brotes.

1.2.2 – Virus entéricos hepatotrópicos

Dentro de esta subclasificación de virus entéricos tenemos como principal patógeno al virus de la hepatitis A (HAV), si bien en los últimos años ha ido ganando importancia el virus de la hepatitis E (HEV). A pesar de estar clasificados dentro de dos familias distintas, ambos poseen características similares que van más allá de su tropismo. Se tratan de virus con capacidad de provocar tanto infecciones agudas como crónicas (esto último solamente HEV) cuya transmisión sigue la ruta fecal-oral, contaminando agua y alimentos, en contraparte con los virus de la hepatitis B y C que tienen una vía de transmisión parenteral. Asimismo, en ambos casos se consideraban virus estrictamente de cápside desnuda, pero recientemente se ha detectado la presencia de partículas pseudoenvueltas mientras dura la infección, despojándose de ellas en el momento de liberarse al ambiente [80,81].

1.2.2.1 – Virus de la hepatitis A

Si bien ciertos aspectos de la hepatitis y sus dolencias fueron ya descritos por Hipócrates, los agentes etiológicos víricos de esta enfermedad no se comenzaron a describir hasta el siglo XX. Previo a la visualización de HAV solo

existía una única fuente de la anteriormente denominada “ictericia epidémica” relacionada con un brote del siglo XVIII a manos de Cleghorn [82]. La caracterización de HAV puede decirse que comenzó a raíz de las epidemias de hepatitis que aquejaron a los soldados en la Primera y especialmente la Segunda Guerra Mundial donde, preocupados por la salud de sus tropas, Inglaterra y Estados Unidos decidieron investigar las hepatitis víricas. Lo que comenzó con una diferenciación entre hepatitis infecciosa (transmitida a través de agua y alimentos) y serológica (que fue relacionada con la administración de la vacuna de la fiebre amarilla) culminó con la visualización del virión de hepatitis A el año 1973 gracias a la microscopía electrónica [83].

Las partículas de HAV poseen una simetría icosaédrica de 28 nm de diámetro, y con una simetría pseudo T=3 debido a que los capsómeros maduros están constituidos por cuatro proteínas (VP1, VP2, P3 y VP4) aunque durante la formación de la cápside VP4 y VP2 se encuentran fusionadas en una proteína llamada VP0. La cápside madura otorga a HAV una gran resistencia a altas temperaturas y pH muy ácidos [84].

El genoma de HAV está compuesto por una única molécula de +ssRNA de aproximadamente 7.5 kb, unido a una VPg en 5' y terminando en una cadena de poli(A) en su extremo 3'. La principal característica del genoma de HAV y de toda la familia *Picornaviridae* es la presencia de una compleja estructura secundaria denominada Sitio Interno de Entrada del Ribosoma (IRES, su nombre en inglés; Internal Ribosome Entry Site), indispensable para el ciclo replicativo del virus. Los IRES de la familia *Picornaviridae* están clasificados en función de su estructura y por ende interacción con proteínas relacionadas con el ciclo del virus, teniendo HAV un IRES que no se encuentra en ningún otro picornavirus [85]. La poliproteína de HAV se divide en tres secciones llamadas P1, P2 y P3. P1 contiene la información de las cuatro proteínas estructurales ya mencionadas, así como 2A, una proteína que en los demás picornavirus se encuentra en la

siguiente sección, y que en el HAV es esencial para la morfogénesis del virión [86]. Tras éstas se halla P2, que contiene las proteínas 2A, 2B y 2C. El fragmento P3 tiene las proteínas no estructurales 3A, 3B (VPg), 3C_{pro} (proteasa) y 3D_{pol} (RdRp). Esta organización es distinta a la de muchos virus +ssRNA ya que por lo general las NSP se hallan en el extremo 3' del genoma.

1.2.2.1.1 - Ciclo replicativo de hepatitis A

Una de las características diferenciales del ciclo de hepatitis A respecto al de otros virus es el tiempo requerido para completar un ciclo. Mientras la mayoría de patógenos víricos requieren pocas horas desde su entrada en la célula hasta la salida de la nueva progenie, HAV tarda días en terminar un ciclo, ya que su replicación comienza como muy pronto 12 horas después del inicio de la infección [87,88]. De igual forma, HAV se caracteriza por poseer un uso de codones significativamente distinto al de la célula hospedadora [89]. Este hecho puede ser, probablemente, consecuencia de su incapacidad de producir silenciamiento celular al no codificar una proteína 2A con actividad proteasa presente en el genoma de otros picornavirus [90], con lo que no puede utilizar los RNA de transferencia (tRNA) más comunes de la célula con la eficacia que otros patógenos de la misma familia [91]. La proteína 2A de HAV está implicada en la correcta formación de la cápside estabilizando los protómeros en vez de producir el silenciamiento celular [86].

El virus llega al lumen intestinal gracias a agua o alimentos contaminados. No está claro si hay una primera replicación del virus en el intestino o si directamente pasa la barrera intestinal mediante transcitosis para llegar torrente sanguíneo y, de éste, al hígado. El receptor utilizado por el virus tampoco está claro; en un principio se pensó que era TIM-1 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 1), anteriormente conocida como HAVcr-1 [92]. Dicha proteína está implicada en la entrada de diversos virus envueltos [93,94], y hasta hace poco se creía la principal molécula

que permitía la entrada del virus, si bien recientemente se ha visto que no es esencial para que HAV se una y entre en la célula diana en hepatocitos [95]. En los ensayos con líneas celulares la importancia de TIM-1 en la entrada del virus es relativa y condicionada por el tipo de célula, teniendo un peso mayor en las células derivadas de riñón que en las células hepáticas [96], probablemente debido a la diferencia en el nivel expresión de TIM-1 entre hígado y riñón [97].

Una vez ha interactuado con el receptor el virus entra en la célula mediante el mecanismo de la endocitosis. Este proceso va seguido de una desencapsidación para liberar el genoma de HAV en el citoplasma de la célula mediante un proceso distinto al de los demás miembros de la familia *Picornaviridae*, debido principalmente a las particularidades estructurales de la cápside de HAV [84], así como a la presencia de dos tipos de partículas infecciosas con distintas cinéticas de desencapsidación [88]. Ambas propiedades hacen que la liberación del RNA de HAV en la célula no esté sincronizada y que sea mucho más lenta de lo habitual, llegando a tardar varias horas en culminar. La desencapsidación requiere de la formación de unos poros en los endosomas que probablemente se produzcan gracias a la interacción de VP4 con la membrana endosomal [98].

Con el +ssRNA liberado, éste se desprende de su VPg y el virus comienza una primera traducción de la poliproteína gracias al elemento IRES, que interactúa con los factores de traducción gracias a su estructura secundaria [99]. En la traducción el ribosoma puede iniciar la síntesis de la poliproteína en uno de los dos codones AUG cercanos al IRES, dando lugar a dos VP4 con diferente secuencia amino terminal [100]. El proceso de traducción es lento debido al sesgado uso de codones ya mencionado, y durante este proceso la cistein-proteasa 3D_{pro} hace un primer corte entre 2A y 2B dividiendo la poliproteína en dos. Posteriormente 3D_{pro} cortará entre 2C y 3A, y finalmente separará todas las proteínas a excepción de VP0. Es en ese momento en el que 2C se encargará de

reclutar las membranas necesarias para formar el complejo de replicación [101]. En esas membranas se unirá la proteína 3A para anclar a 3B, proteína encargada de hacer de primer para iniciar la replicación del genoma a partir del molde de -ssRNA previamente formado.

Completada la replicación, comienza la fase tardía del ciclo, en la cual se formarán las cápsides de la nueva progenie de HAV. Durante el proceso se liberan mediante proteólisis las proteínas VP0, VP3 y VP1-2A, formándose finalmente la ya mencionada estructura pseudo T=3. Existe controversia en si las cápsides se generan alrededor de las copias de RNA del virus o si el genoma se inserta una vez las cápsides están formadas, siendo dos modelos igualmente aceptados en la morfogénesis de las cápsides de los picornavirus. Una vez formada la cápside y con el +ssRNA en su interior, el propio genoma cataliza el corte que separa VP0 en las proteínas VP2 y VP4, dando lugar al virión maduro e infeccioso [102].

La salida del virus ocurre gracias a la interacción con endosomas mediante el sistema ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport). El virus interactúa con el sistema ESCRT y entra en los endosomas generando los cuerpos multivesiculares (MVB) y adquiriendo en el proceso las pseudomembranas con las que se detectan las partículas de HAV en plasma. Los MVB son enviados hacia la membrana plasmática, liberándose así la nueva progenie de HAV [103]. Estos virus pueden o bien iniciar nuevos ciclos infectando células vecinas o bien pasar por el canalículo biliar para volver al intestino y ser excretados, perdiendo la pseudoenvuelta en el proceso. Cuando una partícula envuelta infecta a otra célula para iniciar un nuevo ciclo, el proceso de endocitosis es más lento, ya que requiere de la maduración del endosoma a lisosoma para que la cápside pueda liberar el genoma en la célula hospedadora [104].

1.2.2.1.2 - Filogenia del virus de la hepatitis A humano y emergencia del genotipo IIIA

Una de las principales particularidades de hepatitis A es el hecho de existir, según la secuencia de la proteína VP1, hasta seis genotipos distintos [105,106], aunque todos se incluyen en un único serotipo al no haber variabilidad en el sitio de neutralización antigénico [107], lo cual permite, en general, inmunizar a la población contra la mayoría de los genotipos de HAV con solamente una vacuna. Se han descrito ciertas variantes que pueden escapar de protección que ofrece la vacuna [108,109], pero aun así son escasos ya que los epítomos de la cápside o sus cercanías poseen codones raros cuya modificación podría comprometer el correcto plegamiento las proteínas estructurales. Esto dificulta la aparición y emergencia de nuevos serotipos al haber un delicado equilibrio entre la diversidad antigénica y la consistencia de la cápside [110].

Los genotipos I, II y III son los únicos capaces de infectar a seres humanos, habiéndose aislado los genotipos IV, V y VI en simios. Son precisamente los genotipos humanos los que más diversidad poseen, teniendo los genotipos I y III dos subgenotipos cada uno, A y B [113]. La reclasificación del antiguo genotipo VII como una variante del genotipo II ha derivado en la descripción de dos subgenotipos dada la divergencia entre ambos clusters [111,112], (Figura 5). Se ha propuesto la existencia de un tercer subgenotipo dentro del genotipo I, el IC [114].

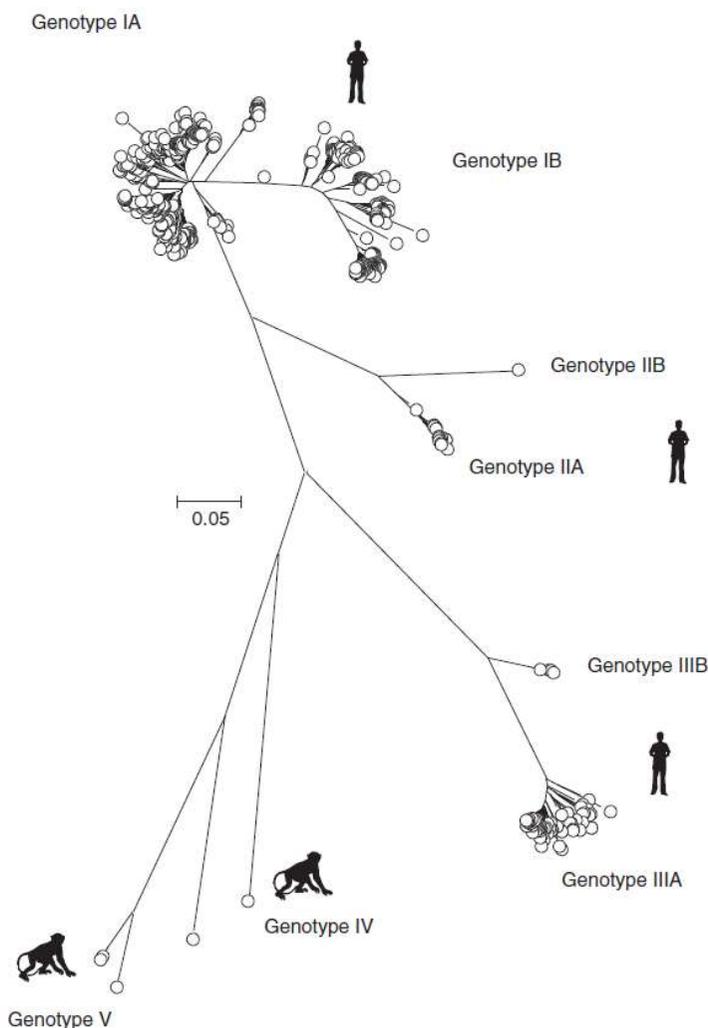


Figura 5: Árbol filogenético de HAV en función de la secuencia de la proteína VP1. El genotipo IIB corresponde al antiguo genotipo VII, cuya única secuencia fue hallada en Sierra Leona. El genotipo VI no es visible en la imagen al no haber una secuencia de VP1 para dicho genotipo, si bien según otro árbol en [111] estaría más cerca del genotipo IV que del genotipo V. Imagen extraída y editada de [112].

Los diversos genotipos tienen diferencias claras en su distribución geográfica. Los genotipos IA, IB y IIIA se encuentran en todo el mundo, si bien generalmente es el genotipo IA el más numeroso en América, Europa y ciertas partes de Asia y África. IB predomina en Oriente Medio y Sudáfrica, y IIIA es el que más casos de hepatitis A provoca en la India y Pakistán [112,115,116]. Los

genotipos que no se distribuyen globalmente han sido detectados en áreas muy delimitadas; IIA solo ha sido identificado en Francia, y la única secuencia de IIB se encontró en Sierra Leona. Finalmente, el genotipo IIIB solo se ha identificado en Corea, Japón y España [112].

Pese a tratarse de un virus con una escasa capacidad evolutiva en términos de secuencia aminoacídica y serología, el cambio en la distribución geográfica de los genotipos de HAV pueden provocar una re-emergencia de casos, especialmente en regiones endémicas o en colectivos que no han recibido la vacuna. Un buen ejemplo lo hallamos en Cataluña, donde desde 1999 se administró la vacuna contra HAV a los 12 años, con los casos relacionados con el genotipo IIIA [117]. Si bien la vacunación permitió un claro descenso en el número de casos de hepatitis A, se vio un aumento de casos de hepatitis a en niños menores de cinco años provocados por este genotipo. Junto con la relevancia del incremento en la incidencia en dicho colectivo, hay que tener también en consideración que en los niños menores de cinco años HAV suele cursar con infecciones asintomáticas [118]. El detectar el incremento de casos de hepatitis en menores de 5 años se debe a que el genotipo IIIA sí causa sintomatología, incluso en grupos que generalmente pasan la infección sin manifestaciones clínicas, lo cual hace de su emergencia en áreas geográficas donde no es habitual algo cuya vigilancia es prioritaria. A día de hoy la vacuna contra HAV se administra a los niños entre los 12 y 23 meses [119].

1.2.2.1.3 - Epidemiología de hepatitis A

Al tratarse de un virus con un ciclo infeccioso tan lento, los primeros síntomas no se manifiestan hasta pasado un período de incubación que puede ir de los 15 a los 50 días, durando normalmente alrededor de 4 semanas [120]. Las infecciones por HAV también pueden cursar con infecciones asintomáticas, tal y como se ha mencionado anteriormente, y con cuadros de hepatitis fulminante. Hepatitis A se caracteriza por ser una enfermedad que nunca cronifica, si bien puede llegar a durar hasta seis meses hasta que la infección se resuelve [121]. El virus se excreta en las heces pasados los 10-12 primeros días, antes de que se manifiesten los síntomas. Tras un pico que ocurre dos semanas antes de la aparición de síntomas. A partir de ahí, el título de HAV en heces va decreciendo, hasta desaparecer generalmente pasadas tres semanas [120]. Esa excreción previa a los síntomas favorece la diseminación del virus y por tanto dificulta el control de los brotes.

Hepatitis A cursa generalmente sin síntomas en niños, y mientras que los adultos sí desarrollan la enfermedad. La sintomatología de la infección por HAV son inespecíficos, con lo que se requiere de la detección del patógeno en suero o heces para poder determinar que HAV ha sido el agente causal. El cuadro clínico más común incluye ictericia, heces de color pálido, orina oscura, fiebre, náuseas, vómitos, malestar general y dolor abdominal. Existen también casos de cuadros clínicos más graves o atípicos. Uno de ellos, la hepatitis A recidivante, consiste en un segundo pico de detección de aminotransferasas pasadas entre cuatro y siete semanas del primer pico. En otros casos puede dar lugar a una colestasis prolongada acompañada de prurito y pérdida de peso [121,122], entre otras manifestaciones clínicas como pueden ser daños renales agudos y cuadros extrahepáticos que pueden provocar anemia, artritis, pancreatitis aguda o complicaciones neurológicas. Finalmente, hay casos infrecuentes en los que HAV puede provocar casos de hepatitis fulminante. Dado que los pacientes que han

sufrido este tipo de hepatitis tienen una baja carga de RNA vírico en sangre y un elevado nivel de bilirrubina, se considera que el daño hepático que provoca este tipo de cuadro se debe especialmente a la respuesta inmune más que al propio HAV [123].

Tal y como se ha mencionado anteriormente, una vacuna monovalente es suficiente como para inmunizar a la población frente a prácticamente cualquier variante de HAV por su escasa variabilidad serológica. Se han desarrollado tanto vacunas atenuadas como vacunas inactivadas para prevenir la hepatitis A [124]. En el terreno de las vacunas inactivadas tenemos aquellas que únicamente inmunizan contra hepatitis A, como son HAVRIX® (GlaxoSmithKline) y VAQTA® (Merck) [120], disponibles actualmente para su administración, o aquellas que están combinadas con otro patógeno. A día de hoy existen dos vacunas combinadas que contienen hepatitis A; una de ellas inmuniza también contra hepatitis B (Twinrix®) [125,126] mientras que la otra protege contra la fiebre tifoidea además de hepatitis A (Vivaxim®) [127]. Por norma general la cobertura de todas las vacunas mencionadas es alta, si bien se recomiendan dos dosis, administrándose la segunda unos seis meses después de la primera, para que sean totalmente eficaces [128].

Las vacunas atenuadas han sido desarrolladas especialmente en China, y están basadas en dos cepas concretas de HAV; H2 y L-A-1, siendo únicamente distribuidas en dicho país y en el sector privado de la India [124,129]. Además de haber mostrado también una buena eficacia, tienen la ventaja de necesitarse únicamente una dosis para que proteja contra HAV. La principal contraparte de esta vacuna, y la de todas las atenuadas en general, es el riesgo de que el patógeno atenuado sufra mutaciones que lo reviertan a su forma infecciosa.

1.2.2.2 - Virus de la hepatitis E

El virus de la hepatitis E es el quinto agente causal vírico de hepatitis que se descubrió. Los primeros indicios de la existencia del virus datan de 1978, momento en el que HAV dejó de ser el único agente causal de hepatitis vírica transmitido por agua y alimentos [130]. Su visualización por microscopía electrónica no llegó hasta el año 1983 gracias al virólogo ruso Mikhail Balayan quien logró replicar el virus administrándose a sí mismo material contaminado de pacientes asiáticos [131]. La gran importancia de este virus residen en la capacidad de infectar un amplio espectro de mamíferos; además del humano se han registrado infecciones en cerdos, murciélagos, camellos, ratas, conejos, mangostas, jabalíes y ciervos, así como también se ha descrito en pollos y la trucha degollada [132,133]. Se considera un virus reemergente y zoonótico gracias a los genotipos con reservorios animales [131,133].

HEV es un virus de cápside desnuda icosaédrica con un diámetro de entre 27 y 34 nm y similitudes estructurales con la familia *Caliciviridae*, comprendiendo una simetría T=3 con 180 copias de una única proteína estructural [134]. La proteína de la cápside se puede dividir en tres dominios distintos llamados S, M y P. El dominio S es el que conforma la estructura básica de la cápside, siendo además la región más conservada de la proteína, el dominio P es el que posiblemente tenga la función de interactuar con el receptor del virus para entrar en la célula e iniciar el ciclo. Finalmente, el dominio M tiene la función de unir los dos dominios previamente mencionados y otorgan estabilidad al virión [135].

La cápside contiene una única molécula de +ssRNA con un tamaño aproximado de 7.2 kb (6.7 kb en el HEV aviar), y pequeñas regiones no codificantes 5' (5'-UTR) y 3' (3'-UTR) de tamaños variables. La longitud media del 5'-UTR de HEV es de 26 nucleótidos, pero algunas cepas llegan hasta los 35

nt mientras que en otras no se ha reportado la presencia de un 5'-UTR. Algo similar ocurre con 3'UTR, teniendo una media de 65 nt de longitud tras el cual hay una cola de poli(A) [136]. El genoma está organizado en tres ORF con un cierto solapamiento entre ORF2 y ORF3. ORF1, el más grande de todos ellos, codifica para siete proteínas no estructurales. ORF2 contiene la información de la proteína de la cápside, mientras que ORF3 permite la traducción de una proteína multifuncional llamada vp13. En el genotipo 1 de HEV hay, dentro de los cerca de 5.1 kb que conforman el ORF1, un ORF4 cuya función es incrementar la replicación estimulando la RdRp del virus. La expresión de ORF4 está condicionada por un elemento similar a IRES localizado entre las posiciones 2701 y 2787, que se activa en condiciones de estrés en el retículo endoplasmático [137]. En el genoma de HEV hay dos elementos cis-reactivos (CRE) con una cierta estructura secundaria; uno de ellos tras ORF1 y el segundo en 3'UTR, siendo

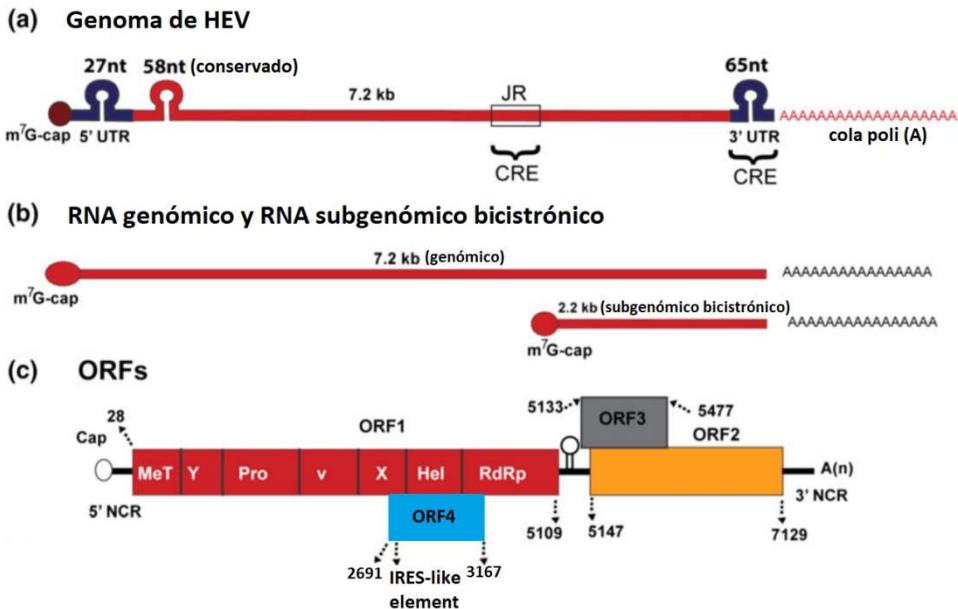


Figura 6.: Organización genómica de HEV. Además de la representación esquematizada del genoma en (a) y de la comparativa entre el RNA genómico y subgenómico (b) se puede apreciar en (c) los cuatro ORFs descritos en HEV y las posiciones aproximadas de sus extremos, así como las diversas proteínas que codifican en ORF1. El dominio “v” que figura en la poliproteína de ORF1 corresponde a una región hipervariable que, si bien no se sabe su función, marca la eficiencia de la replicación del virus. Cabe recordar que ORF4 solo ha sido descrito en el genotipo 1 de hepatitis E. Imagen adaptada de [133].

cruciales para la replicación de HEV [138]. Durante la infección se produce un RNA subgenómico únicamente con los ORF2 y 3 [135,139].

1.2.2.2.1 - *Ciclo replicativo del virus de la hepatitis E*

A falta tanto de un sistema de cultivo in vitro de HEV como de un modelo animal, existen muchas incógnitas que rodean el ciclo infeccioso de HEV. Si bien se ha descrito que la unión a proteoglicanos de heparin sulfato tiene un papel en la adhesión del virus a la célula [140,141] no se ha identificado todavía cuál es el receptor que le permite la entrada. Algunos estudios sugieren que el virus se uniría al receptor mediante el dominio M de la proteína de la cápside [142]. También es posible que el dominio P tenga un papel en la entrada al poseer lugares de unión a polisacáridos. Estos mismos sitios podrían estar relacionados con la desencapsidación [143].

Con el RNA libre en el citosol de la célula, se inicia la traducción de las poliproteína codificada en el ORF1, con diversos dominios catalíticos que llevan a cabo todas las funciones necesarias en el ciclo replicativo. Todavía no está claro si los diversos dominios deben separarse para llevar a cabo su función o si, por el contrario, tienen actividad catalítica en forma de poliproteína [144]. El dominio proteasa de HEV es una PCP (*Papain-like Cysteine Protease*) con diversas similitudes con la hallada en el virus de la rubeola [145]. La PCP actúa junto a la metiltransferasa y el dominio X de HEV para inhibir el interferón de tipo 1, bloqueando la respuesta inmune innata. Dicha inhibición la consiguen gracias a la supresión de RIG-I por parte de PCP y al bloqueo de la cascada de inducción del INF- β (interferón beta) por parte de la metiltransferasa y del dominio X [146,147]. El dominio Y de la poliproteína tiene un papel importante, aunque desconocido, en la replicación del virus, ya que las alteraciones en su secuencia o estructura secundaria afectan a dicho proceso [148]. Además de la inhibición del interferón, el dominio X del virus haría la función de la ADP-ribosa-1'-monofosfatasa (Appr-1'-pase), catalizando el corte entre el tRNA y el aminoácido

que transporta [149]. Finalmente, el dominio helicasa se encargaría de abrir las cadenas de RNA para separar el +ssRNA del virus del -ssRNA que sintetizaría primeramente la RdRp. Junto a eso, es la encargada de catalizar la formación del 5'-cap dada su actividad fosfatasa. La proteína de ORF4 estimularía la actividad de la RdRp interactuando con los dominios X, RdRp y helicasa para formar un complejo de replicación [135].

Una vez sintetizado el -ssRNA y separado de la cadena de polaridad positiva mediante la helicasa, se utilizará de molde para generar tanto RNA genómico como subgenómico. A partir de ahí se traducen ORF2 y ORF3, dando lugar a la proteína de la cápside y a la vp13, respectivamente. El ensamblaje es un proceso todavía muy poco conocido, pero se especula que la encapsidación se hace alrededor del genoma del virus mediante un reconocimiento de una secuencia de 76 nt localizado en ORF1 por el extremo amino terminal (N-ter) de la proteína de la cápside. El reconocimiento permitiría la formación de dímeros uniéndose dos proteínas estructurales por su extremo carboxilo terminal (C-ter). Una vez la cápside está formada la proteína vp13, tras fosforilarse, participaría en el transporte y la salida de los viriones. HEV aprovecharía las vesículas intracelulares para salir, adquiriendo la pseudomembrana en el proceso de entrada a la vesícula, dando lugar a MVB. La salida del virus culmina gracias a una vía exosomal ayudada por vp13, ya que actúa a modo de canal iónico que daría permeabilidad a la membrana celular [150].

Al liberarse los viriones de HEV de la célula permanecen con la pseudoenvuelta en el torrente sanguíneo, perdiéndose únicamente tras pasar por el canalículo biliar en su retorno al intestino para ser excretados. Si las partículas pseudoenvueltas infectan otra célula, tendrán una adhesión celular menos eficiente y un mecanismo de entrada distinto, basada en una endocitosis mediada por clatrina y dineína-2 [151], en el que se requieren Rab5, Rab 7 y GTPasas para la internalización del virus. Una vez dentro, antes de liberarse al

citosol y desencapsidarse, se requiere una previa degradación de la pseudoenvuelta en el lisosoma [141,152].

1.2.2.2 - Filogenia y potencial zoonótico de HEV

El virus de la hepatitis E ha pasado por varias familias de virus antes de llegar a la filogenia actual. Al poco de descubrirse se clasificó dentro de la familia *Picornaviridae* al tratarse de otro virus entérico causante de hepatitis. Tras eso pasó por la familia *Caliciviridae* al verse similitudes morfológicas y genómicas con dicha familia, incluyendo en esta familia el género *Hepevirus*. Finalmente, los análisis genotípicos lo situaban demasiado lejos de los calicivirus, con lo que se separó el género *Hepevirus* para formar una nueva familia, *Hepeviridae* [132]. A día de hoy la familia *Hepeviridae* contiene dos géneros: *Piscihepevirus* y *Orthohepevirus*. El primer género comprende únicamente un virus hallado en trucha degollada [153]. *Orthohepevirus* está dividido en cuatro especies; *Orthohepevirus A-D*. *Orthohepevirus B* posee un único genotipo que infecta a aves [154-156], mientras que *Orthohepevirus C* se ha descrito en ratas, bandicuts, visones, hurones y musarañas. Estas dos especies no son capaces de infectar a humanos. El genotipo que conforma *Orthohepevirus D* tiene como hospedador los murciélagos [156]. Actualmente se ha propuesto la ampliación de *Orthohepevirus C* con dos genotipos nuevos, con lo que llegaría a tener cuatro [157].

Orthohepevirus A es la especie más extensa, con siete genotipos descritos en la actualidad (llamados HEV-1 a HEV-8). De éstos, HEV-1, HEV-2, HEV-3, HEV-4 y HEV-7 son capaces de infectar a humanos, siendo el único hospedador de los dos primeros. Los otros tres han ido aislados también de otros mamíferos tales como cerdos, ciervos y conejos. HEV-7 es un caso especial ya que se consideraba único de camellos, pero recientemente se describió una infección de este genotipo en un paciente que padeció una infección crónica tras un trasplante. Los genotipos HEV-5 y HEV-6 solo se han aislado en jabalíes (Figura 7) [135]. El octavo genotipo de HEV, recientemente propuesto y aceptado,

también tiene como reservorio los camellos y muestra potencial zoonótico [158,159].

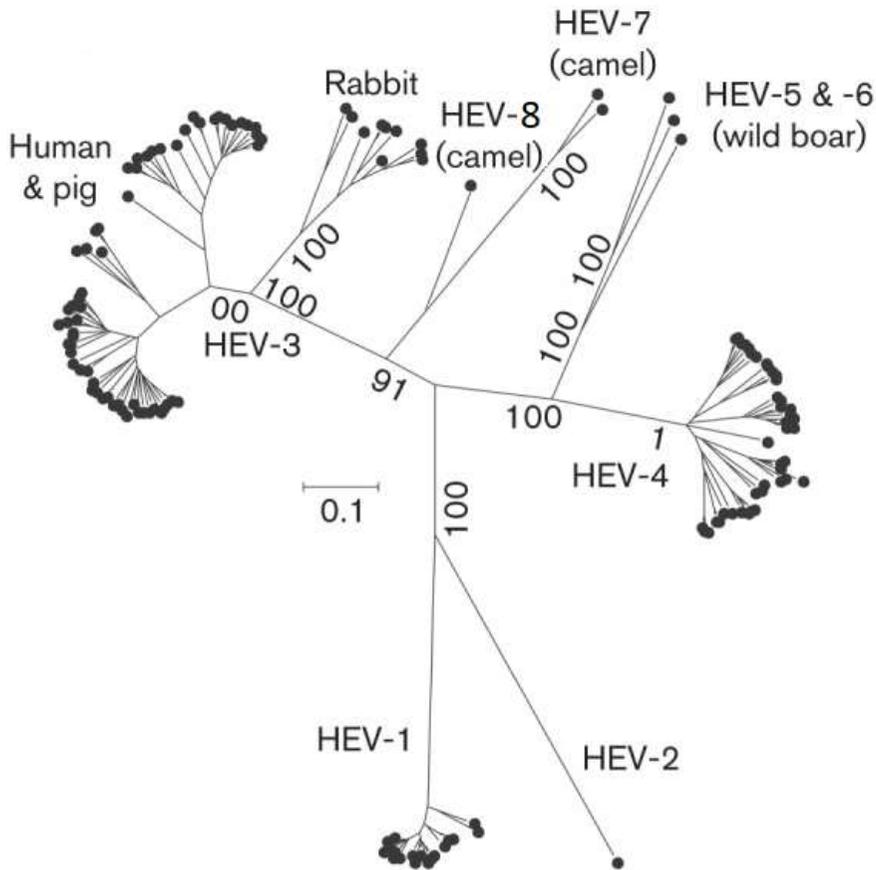


Figura 7: Árbol filogenético de los ocho genotipos que conforman la especie *Orthohepevirus A*. La localización de HEV-8 en el árbol y su distancia con HEV-7 es aproximada al haber sido añadida en el árbol en base a otra figura sobre la filogenia de HEV disponible en [159]. Imagen editada de [156].

Esta diversidad de hospedadores en cuatro de los ocho genotipos que conforman *Orthohepevirus A* demuestran el riesgo de emergencia de nuevas variantes de HEV gracias a su potencial zoonótico, que cada día se considera mayor ya que constantemente se descubren nuevos hospedadores para este virus [160]. Dicho riesgo se incrementa cuando el principal reservorio no humano del virus es el cerdo. Diversos estudios alrededor del mundo han detectado

seroprevalencias altas para anticuerpos de HEV en este animal, yendo desde el 30% hasta el 80% [161-164]. Junto a eso, y al igual que pasa con otros patógenos como el virus de la gripe, el cerdo puede hacer de puente, permitiendo que genotipos hasta ahora exclusivamente animales infecten a humanos. Esto se debe a que se ha descrito cierta susceptibilidad del cerdo a cepas de HEV aisladas de jabalíes, si bien el estudio solo ha mostrado la susceptibilidad con HEV-3 [165].

La distribución geográfica de los genotipos que infectan a humanos está claramente segregada, hallándose hepatitis E causadas por los genotipos 1 y 2 en los países en vías de desarrollo y por los genotipos 3 y 4 en los países desarrollados [132,166]. La prevalencia de seropositividad es en general más elevada en países en vías de desarrollo que en los países desarrollados. Asimismo, dentro de un mismo país la prevalencia aumenta en las zonas rurales respecto a las urbanas [167-169]. Las diferencias entre los genotipos, disponibilidad de agua y el nivel socioeconómico también influyen en la principal vía de transmisión de HEV. Mientras que en los países en vías de desarrollo la vía principal de infección es el agua, allá donde los casos son más esporádicos los casos de HEV se dan especialmente por el consumo de carne contaminada mal cocinada [166,170].

1.2.2.2.3 - Epidemiología de hepatitis E

Se calcula que aproximadamente un tercio de la población mundial ha pasado por una infección de HEV [171]. Cada año se estima que HEV infecta a 20 millones de personas, de los cuales 3,3 millones contraen la enfermedad, dando lugar a unas 44.000 muertes en el año 2015 [166,172]. La población principalmente afectada por la enfermedad depende de la región; en países en vías de desarrollo la mayoría de las infecciones ocurren en pacientes jóvenes y mujeres embarazadas. En países desarrollados ocurre lo contrario; hay más casos de HEV en hombres y su edad es más avanzada respecto a las regiones endémicas [173].

El período de incubación de la enfermedad una vez se ha ingerido el virus dura entre dos y seis semanas, y tras dicho período se manifiestan síntomas típicos de una hepatitis vírica; fiebre, náuseas, dolor abdominal, vómitos, anorexia, malestar general y hepatomegalia. La ictericia no es un síntoma generalizado en hepatitis E en las regiones endémicas, dándose solo entre un 40 y un 75% de los casos en países en vías de desarrollo o desarrollados, respectivamente [174]. Al contrario que en áreas endémicas, la ictericia es el síntoma más común en las regiones donde los casos son esporádicos [175]. Los síntomas desaparecen tras superar la enfermedad pasadas unas 4-6 semanas, siendo por lo general autolimitante. Aun así, hay ocasiones en las que la persona infectada desarrolla una enfermedad crónica. Estos casos se han descrito en pacientes inmunosuprimidos y con el genotipo 3 [176], con la única excepción de un niño con hepatitis E crónica asociada al genotipo 4 [177].

En las áreas donde la prevalencia de HEV es alta se dan tanto casos de enfermedades asintomáticas como enfermedades inespecíficas que no se pueden distinguir de cualquier otra dolencia provocada por un virus. De igual forma en las regiones endémicas se producen cuadros más graves de colestasis o daños severos en el hígado que puede desembocar en fallos hepáticos agudos o subagudos [173].

Además de la capacidad de dar lugar a una hepatitis crónica, HEV puede provocar cuadros severos en mujeres embarazadas, especialmente en áreas endémicas, por lo que estos sucesos se asocian únicamente a los genotipos 1 y 2 [174]. La mortalidad en mujeres embarazadas en esas regiones puede llegar a ser extremadamente elevada [178]. Las causas de la alta severidad de la enfermedad en el periodo de gestación todavía se desconocen, pero se sabe que el riesgo de contraer una enfermedad sintomática que derive en fallo hepático o enfermedades obstétricas es más alto en el segundo y tercer trimestre, así como la mortalidad aumenta en los últimos tres meses de embarazo [141,179]. Además,

el feto se puede ver afectado de varias formas; una de ellas es la transmisión vertical de HEV, cosa que puede provocar abortos o incrementar la morbilidad y mortalidad de los neonatos que sobreviven a la infección durante la gestación [132,166,174].

Otro de los motivos que hacen de la infección por HEV algo preocupante son las manifestaciones extrahepáticas que puede llegar a tener, dándose tanto en infecciones agudas como en crónicas. Las más comunes son manifestaciones neurológicas como el síndrome de Guillain-Barré, encefalitis, mielitis, y amiotrofia neurálgica. Aun así se han reportado infecciones de HEV que han afectado otros órganos, dando lugar entre otros a pancreatitis, crioglobulinemia, linfoma, tiroiditis y miocarditis [180–183].

1.2.3 – Virus entéricos neurotrópicos: *Enterovirus*

El género *Enterovirus* es uno de los que conforman la familia *Picornaviridae*, tratándose de un gran grupo que comprende una amplia variedad de virus clasificados en quince especies distintas (*Enterovirus* (EV) A-L y *Rhinovirus* (RV) A-C) [184]. Dado que las tres especies de *Rhinovirus* son patógenos respiratorios y tienen una vía de transmisión por fómites y aerosoles, los más importantes a la hora de contaminar el medio acuático son los incluidos en la especie *Enterovirus*.

Las partículas de EV tienen la estructura característica de cualquier picornavirus; una cápside de aproximadamente 30 nm de diámetro construida a partir de cuatro proteínas estructurales (VP1-4) que le otorga una simetría pseudo T=3. El genoma completo del virus tiene una longitud de entre 7.1 y 7.5 kb cuyo extremo 3' está protegido por una proteína VPg y su extremo 5' termina en una cola de poli(A). El 3'-UTR de EV, al igual que en toda la familia

Picornaviridae, posee un elemento IRES indispensable para llevar a cabo el ciclo infeccioso del virus. El IRES de EV es de tipo I, con una longitud aproximada de 450 nt y cinco estructuras secundarias que interaccionan con las proteínas celulares implicadas en la traducción del genoma del virus de una forma distinta a la de otros IRES [185].

Si bien el miembro más conocido y representativo ha sido poliovirus (PV), se conocen a día de hoy más de 300 serotipos (más de la mitad de ellos *Rhinovirus*) debido a la gran diversidad tanto a nivel antigénico como genético que hay en el género *Enterovirus* [186]. Esa variedad hacen de EV un género cuyos órganos diana pueden ser muy variables, y con ese amplio rango de tropismos pueden dar lugar a todo tipo de enfermedades como gastroenteritis, pleurodinia, conjuntivitis hemorrágica, miocarditis, pericarditis o ambas, encefalitis y meningitis aséptica entre muchos otros [184,187-193].

1.2.3.1 - Ciclo replicativo de enterovirus

Al estar localizado en la misma familia que HAV, los diversos serotipos de EV comparten junto con éste y los demás picornavirus muchas de las características de su ciclo infeccioso. Las principales diferencias entre el virus de la hepatitis A y cualquier enterovirus residen en la capacidad de estos últimos de producir silenciamiento celular gracias a una proteína 2A con actividad proteolítica. Asimismo, y dado el papel que posee 2A en el resto de picornavirus, no tiene un papel en la morfogénesis de la cápside como el que se ha explicado en HAV.

Los diversos EV se transmiten por distintas vías según cuál es el tejido diana; a través de agua y alimentos, a través de contacto persona-persona o por fómites [194]. Algunos incluso pueden no utilizar la ruta fecal-oral y transmitirse

vía aerosoles, como es el caso enterovirus D68 [195,196]. El tropismo de EV, además de por la vía de transmisión, se debe a la gran cantidad de receptores que pueden llegar a reconocer, no habiendo ni un único receptor por serotipo ni exclusividad en el uso de los receptores. EV es capaz de reconocer moléculas tan distintas entre ellas como pueden ser el ácido siálico y receptores de lipoproteínas y si bien la gran mayoría se trata de proteínas, hay algunos casos como el de EV D68 donde algunas variantes pueden usar carbohidratos como receptor [197].

Tras ese reconocimiento se produce una endocitosis con una consiguiente desencapsidación donde se produce una desestabilización de la cápside que da lugar a la liberación del ácido nucleico. La entrada del genoma del virus en la célula se produce gracias a la formación de unos poros a partir de la hexamerización de VP4 miristorilado en la membrana del endosoma tras la liberación de los pocket factor, unos lípidos que se encuentran en la región hidrofóbica de VP1 y da estabilidad a la cápside [198]. Una vez se libera el pocket factor, VP1 se reestructura de forma que se adhiere a la membrana endosomal y el genoma se libera al citosol celular a través del poro formado por VP4.

La primera traducción se produce rápidamente tras la liberación del +ssRNA de EV, mediada por el IRES. A partir de ahí, la 3D_{pol} sintetizada se encarga de la replicación, utilizando la proteína VPg (3B) como primer para producir la cadena negativa que servirá de molde para replicar el genoma del virus. Tras haber procesado la poliproteína, las proteasas 3C_{pro} y 2A se encargan de inducir el silenciamiento celular inhibiendo tanto la transcripción como promoviendo la traducción independiente de proteína cap, además de llevar a cabo otros procesos como la inhibición del interferón de tipo I. También tienen un papel en la replicación bloqueando la traducción independiente de cap, dejando libre su genoma para que la polimerasa pueda generar la cadena molde [197,199,200].

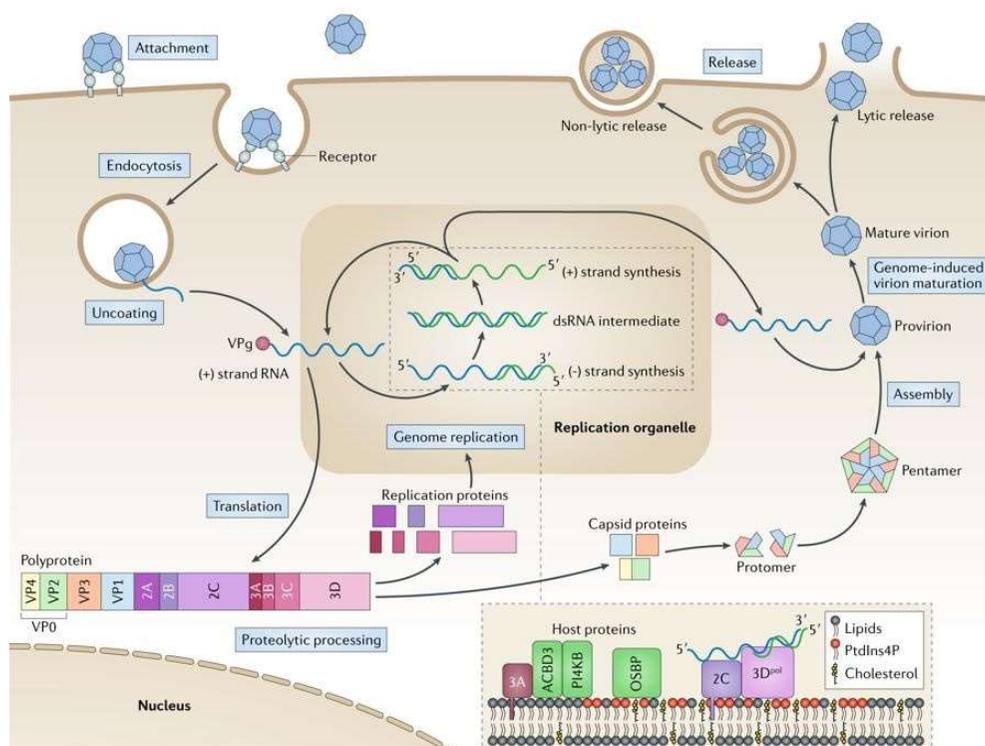


Figura 8.: Esquema del ciclo replicativo de EV. En él se pueden ver las principales características de una infección por este picornavirus, como el hecho de que solamente el genoma sale de la vesícula endocítica, no todo el virión, y el hecho de poder llevar a cabo una liberación de la nueva progenie tanto provocando la lisis celular como prescindiendo de ella. Imagen extraída de [197].

A la vez que se produce la replicación se expresan las proteínas de la cápside en la poliproteína P1, siendo procesada por la 3C_{pro} para dar lugar a las proteínas VP0, VP3 y VP1. Según el modelo aceptado, estas proteínas estructurales se autoensamblan alrededor del +ssRNA en formación para dar lugar a una cápside inmadura. El proceso de morfogénesis termina cuando el RNA del virus promueve la ruptura de VP0 en VP2 y VP4, siendo un paso crucial en la maduración del virión [102,201].

Se consideraba que la salida de las partículas maduras requería la lisis de las células infectadas, provocando así su muerte, pero estudios recientes apuntan a que utilizan el sistema de autofagia celular no solo para culminar su ciclo replicativo, sino también para infectar las células vecinas mediante la regulación

de los lípidos que intervienen en la autofagia [202]. Algunos virus son liberados de nuevo al medio ambiente tras volver al intestino en caso de que su replicación se produzca en otros tejidos, cerrando así el ciclo.

1.2.3.2 - Filogenia de enterovirus

La clasificación del género *Enterovirus* ha ido cambiando a lo largo de los años. Desde 2012 el género incluye quince especies distintas, doce de las cuales corresponden a EV (*Enterovirus A-L*). De todos ellos, los patógenos humanos se incluyen en las especies *Enterovirus A, B, C* y *D*. Las demás especies de EV no tienen representantes cuyo hospedador sea el ser humano, si bien muchos de ellos infectan primates. Las excepciones son las especies *Enterovirus G*, clásicamente porcino pero que tiene serotipos que infectan a jabalíes, ovejas o cabras, *Enterovirus I* cuyo único representante se halló en camellos, y *Enterovirus K*, cuyos hospedadores son roedores [184,203-207] ().

Todos los serotipos de EV humanos se clasifican en cuatro grandes grupos; Enterovirus, Coxsackievirus, Echovirus y Poliovirus. Los serotipos catalogados como *Enterovirus* se encuentran en las cuatro especies humanas. Coxsackievirus está diferenciado en Coxsackievirus A y Coxsackievirus B. Los miembros del primer grupo se encuentran hoy en las especies *Enterovirus A* y *C* (a excepción de Coxsackievirus A9 que está en *Enterovirus B*). Tanto Coxsackievirus B como Echovirus están restringidos a la especie *Enterovirus B*. Poliovirus forma un cluster aparte dentro de *Enterovirus C*.

Tabla 1.: Clasificación de las doce especies de *Enterovirus* y los hospedadores de sus representantes. La mayor parte de los serotipos conocidos se encuentran en las especies *Enterovirus A-C*, cuyo hospedador principal es el ser humano. En comparación, la especie *Enterovirus D* es muy poco frecuente. El asterisco en la especie *Enterovirus L* indica que el serotipo descrito se comenta en un artículo que a día de hoy no ha sido publicado.

Especie	Número serotipos	Capacidad de infectar humanos	Hospedadores no humanos
<i>Enterovirus A</i>	25	Sí	Simios, Babuino
<i>Enterovirus B</i>	63	Sí	Simios, Chimpancé, Mandril
<i>Enterovirus C</i>	23	Sí	---
<i>Enterovirus D</i>	5	Sí	Chimpancé, Gorila
<i>Enterovirus E</i>	4	No	Bovinos
<i>Enterovirus F</i>	7	No	Bovinos
<i>Enterovirus G</i>	20	No	Cerdo, Jabalí, Oveja, Cabra
<i>Enterovirus H</i>	1	No	Simios
<i>Enterovirus I</i>	1	No	Camello
<i>Enterovirus J</i>	6	No	Simios
<i>Enterovirus K</i>	2	No	Roedores
<i>Enterovirus L*</i>	1	No	Mono Rhesus

1.2.3.3 – Epidemiología de enterovirus

Se calcula que anualmente y solo en Estados Unidos EV es causante de hasta 15 millones de infecciones y varias decenas de miles de hospitalizaciones. El número de casos llega a los 1.000 millones en todo el mundo [208,209]. El rango de enfermedades que pueden llegar a causar es muy amplio y las dolencias causadas por EV no están asociadas a serotipos concretos; el mismo tipo de EV es capaz de provocar más de una enfermedad dependiendo de la variante y del estado de salud de la persona infectada, entre otros. La mayor parte de las infecciones provocadas por EV cursan o bien sin síntoma alguno o bien con un cuadro similar al de resfriado común. Sea cual sea la evolución de la infección habrá un período de incubación de entre tres y seis días, y en caso de causar síntomas le sigue un período prodrómico con una duración de entre 12 y 36 horas. Los síntomas que cursan en esta fase son inespecíficos y tienen gran

similitud con el cuadro de un resfriado común; fiebre, dolor de garganta, pérdida de apetito, tos y estornudos. Tras ese período, la forma leve de infección por EV puede dar lugar a aftas bucales, sarpullidos y un leve dolor generalizado en el cuerpo. Generalmente esta forma de la enfermedad es autolimitante y la infección se supera en 5 o 7 días [184,193].

La mayor parte de complicaciones durante el curso de una infección por EV afectan a nivel neurológico o cardíaco. Eso, junto a la diversidad de serotipos existentes, hacen que sean un grupo de patógenos de difícil control y de gran importancia a nivel sanitario.

Las principales complicaciones en una infección por EV son las siguientes:

Enfermedad Mano-Pie-Boca (HFMD): Esta forma de infección de EV se da en niños menores de 10 años, siendo especialmente frecuente en aquellos que tienen entre 3 y 5 años. Los serotipos que pueden provocar HFMD se encuentran en *Enterovirus A, B y C*. La sintomatología de HFMD comprende fiebre, faringitis, así como úlceras y erupciones en manos, pies boca (de ahí su nombre) y nalgas. Asimismo, un síntoma frecuente es la onicomadesis, es decir, desprendimiento de la uña por su zona proximal, apareciendo debajo de ella una uña nueva. En algunas ocasiones se pueden dar complicaciones a nivel neurológico, cardíaco y pulmonar [209,210].

Conjuntivitis hemorrágica: La conjuntivitis hemorrágica causada por EV se conoció también bajo el nombre de “enfermedad del Apolo 11”, dado que fue descrito en un brote que coincidió con el primer alunizaje [211]. Los principales serotipos asociados a esta enfermedad son *Enterovirus D70* y *Coxsackievirus-A24* [188,212]. Se trata de una enfermedad extremadamente contagiosa cuya manifestación es rápida. La enfermedad cursa con enrojecimiento de los ojos, edemas, fotofobia, hemorragia subconjuntival, irritación, reacciones foliculares y

ojos llorosos [213]. En caso de no darse la hemorragia, la sintomatología puede durar menos tiempo [214]. Bajo este cuadro el virus se transmite especialmente a través de fómites o contacto persona-persona [212,213].

Miocarditis y pericarditis: Cuando el tropismo de EV lo lleva a poder infectar el corazón o el pericardio puede darse una infección sin síntomas o bien manifestarse con dolor en el pecho, arritmias, debilidad, fiebre, diarrea, dolor de garganta y en los peores casos fallos cardíacos que pueden llevar a la muerte. También se pueden observar disfunciones en ventriculares, y en neonatos manifestarse otros síntomas como hipotermia, cianosis e hipoxia. Cuando EV infecta a neonatos suelen requerir soporte cardiopulmonar [215].

Hay una diferenciación entre ambas enfermedades según la edad; la miocarditis es más corriente a edades muy tempranas, mientras que los niños y los adultos tienen más tendencia a sufrir de pericarditis. Aun así, se pueden dar infecciones en ambos tejidos (miopericarditis), en cuyos casos la enfermedad se agrava y puede llegar a dar lugar a un infarto [184,216].

Meningitis y encefalitis: Estas dos afecciones neurológicas se distinguen según si está afectado el parénquima cerebral o no, siendo considerados respectivamente encefalitis o meningitis. EV es considerado la principal causa de meningitis aséptica, y su infección tiene como síntomas comunes más comunes dolor de cabeza, estomacal y muscular, fiebre, exantemas y náuseas. Se puede dar además pleocitosis en el líquido cerebroespinal durante las primeras fases. La presencia de los síntomas característicos (rigidez de nuca y fotofobia) aumenta cuanto mayor es la edad de la persona afectada. En neonatos tienden a aparecer protuberancias en las fontanelas y sufrir de letargia e irritabilidad [184,217].

La encefalitis por EV es menos común que la meningitis, pero tiene peor pronóstico. Es fácilmente distinguible de las encefalitis causadas por otros

agentes etiológicos dado que además de los síntomas clásicos de la enfermedad (como pueden ser fiebre, dolor de cabeza, hepatomegalia, hiporreflexia, somnolencia o coma) la diarrea, erupciones cutáneas y cambios de personalidad son mucho más frecuentes. En neonatos hay un mayor riesgo de sepsias y cardiomiopatías, y en menores de 3 años se da la mayor cantidad de muertes tras desarrollar sobre todo edemas pulmonares [217,218]. En la primavera del 2016, en Cataluña se dio un brote de encefalitis causado por el serotipo EV-A71, con más de cien niños afectados [219], cuya alarma ha llevado a una vigilancia de la población de EV que circulan en el área de Barcelona.

Parálisis flácida aguda: La parálisis flácida aguda comienza normalmente con un cuadro inespecífico de fiebre, fatiga dolor de cabeza, vómitos y rigidez de cuello. En las formas severas de la enfermedad el sistema nervioso se ve afectado y se produce una parálisis generalmente en las piernas, pero existe la probabilidad de que la enfermedad afecte a los músculos respiratorios, causando la muerte de la persona infectada.

Esta enfermedad estaba clásicamente asociada a PV, pero con el fruto de los esfuerzos de su erradicación en los que a día de hoy es endémico únicamente en dos países (Afganistán y Pakistán) [220], han comenzado a aparecer brotes de enfermedades con sintomatología similar al de la poliomielitis asociados a otros EV [221]. De igual forma que con poliovirus, las parálisis flácidas provocadas por otros enterovirus afectan especialmente a los niños. De entre todos los agentes causales los más destacables son los EV A71 y D68, si bien *Coxsackievirus* y *Echovirus* contienen agentes causales de dicha enfermedad. A día de hoy los casos más significativos están en los serotipos A71 y D68. A71 es el mayor causante de las formas más severas de la enfermedad, provocando además brotes a gran escala [222,223]. D68 corresponde a un serotipo que hasta hace poco provocaba un número muy limitado de infecciones, al igual que todos aquellos incluidos en la especie *Enterovirus D*, y provocaba enfermedades respiratorias

muy similares a las de RV. Sin embargo los casos de infecciones por D68 han ido en aumento en los últimos años llegando a ser uno de los serotipos comunes que circulan en Estados Unidos [224–226]. Ese aumento de casos ha demostrado sus capacidades neurotrópicas, dando lugar a casos de parálisis flácida provocados por D68, considerándose uno de los serotipos con mayor riesgo de ocupar el nicho que la campaña de erradicación de PV está dejando vacío [226,227].

1.3 – Emergencia de virus envueltos

La emergencia de los nuevos astrovirus, serotipos poco comunes de enterovirus, la aparición del genotipo IIIA de hepatitis A en nuestra región y la capacidad zoonótica de hepatitis E no comprenden todos los ejemplos de virus emergentes con capacidad de llegar al medio acuático. Algunos de los nuevos retos de los virus transmitidos por aguas implican virus envueltos, muchos de los cuales no utilizan explícitamente la transmisión fecal-oral pero pueden llegar a contaminar aguas por sus vías de excreción. De todos estos, los coronavirus (CoV) comprenderían el grupo de mayor relevancia por dos principales motivos; ser uno de los virus con más nuevos representantes descritos en los últimos años y por haber entre ellos CoV emergentes causantes de enfermedades graves con capacidad de transmitirse por alimentos y por la vía ambiental.

Los CoV destacan por ser los virus con genoma de RNA más grandes, con un +ssRNA que puede llegar a medir 31 kb. Existen cuatro grandes géneros dentro de la familia *Coronaviridae*; *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Los dos primeros géneros tienen como principal origen los murciélagos y los otros dos provienen especialmente de aves [228]. Muchos de los nuevos CoV descubiertos pertenecen a los géneros

Alphacoronavirus y *Betacoronavirus*, y de los nuevos CoV que se han detectado en los últimos años destacan dos betacoronavirus; los virus causantes del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) y del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). Con la aparición de estos virus cambió la visión y la importancia clínica de los CoV, ya que hasta entonces solo se conocían como patógenos que causaban enfermedades respiratorias o gastrointestinales leves.

El SARS-CoV fue el primero en ser descrito. A finales de 2002 se inició un brote en el sur de China, en la provincia de Guangdong, extendiéndose por más de una veintena países y saldándose en julio de 2003 con 8096 afectados, provocando la muerte de 774 de ellos [229,230]. Tras ese gran brote solo se describieron unas pocas infecciones de carácter zoonótico en 2004, siendo la última vez en la que se detectó dicho CoV [231]. Aunque fue evidente que se trataba de un patógeno zoonótico, la primera teoría sobre su origen fue errónea. Se consideró inicialmente que el origen de este virus era la civeta, pues los primeros casos se debieron al contacto de civetas infectadas por SARS-CoV que lo transmitieron al ser humano, pero a día de hoy está aceptado que el virus proviene de murciélagos del género *Rhinolopus*, y que la civeta es un hospedador que ha permitido su amplificación y salto al ser humano [232].

MERS-CoV, aislado por primera vez en 2012 y con el camello como intermediario, presenta ciertas diferencias respecto a SARS-CoV. Una de ellas es que a día de hoy continua habiendo casos de personas infectadas por MERS-CoV; en el informe de septiembre de 2019 de la WHO se contabilizaron un total de 2468 casos desde 2012, de los cuales 851 han fallecido debido a la enfermedad [233]. Además, pese a que MERS-CoV presenta una menor infectividad comparado con SARS-CoV, su tasa de mortalidad es mucho mayor (34.84% y 9.56%, respectivamente). Aun así tienen también ciertas similitudes, siendo ambos virus de origen zoonótico, muy posiblemente providentes de murciélago, que causan una enfermedad respiratoria grave en cuyos síntomas se incluyen la

disnea y la neumonía [234]. Desde finales de 2019 fue descubierto un nuevo miembro del género *Betacoronavirus* denominado SARS-CoV2, agente causal de la enfermedad conocida como COVID-19 a día de hoy extendido por toda la geografía y que ha culminado en una pandemia que actualmente sigue en curso [235].

Otro virus envuelto que puede llegar al agua es el de la influenza, que comprende cuatro géneros de la familia *Orthomyxoviridae*. Los más importantes son los virus de la influenza A y B, causantes de las epidemias anuales. Influenza C y el recientemente descubierto influenza D son causantes de enfermedades más leves que los dos ya mencionados. Todos ellos tienen un genoma de -ssRNA segmentado (influenza A y B poseen ocho segmentos mientras que influenza C y D tienen siete) lo cual hace que posean, además de la alta tasa de mutación, la capacidad de reorganizar sus segmentos en un proceso llamado “reassortment” cuando un hospedador es coinfectado por dos virus de la influenza distintos, normalmente uno humano y otro animal.

Con este reordenamiento aparecen rápidamente nuevas variantes del virus con genes típicos de las cepas aviarias y otros de cepas humanas, dando lugar a las pandemias causadas por influenza A [236–238]. El reassortment se da gracias a su amplio rango de hospedadores al usar el ácido siálico como receptor, una molécula que se encuentra en la superficie celular de una gran cantidad de células de muchos organismos, entre ellos todos los vertebrados [239]. El salto de virus de influenza aviar al ser humano, si bien es posible, es un proceso muy poco eficiente, con lo que el reassortment permite que las cepas aviarias puedan infectar y extenderse rápidamente en la población. Generalmente el hospedador que favorece este proceso es el cerdo [240].

La mayor parte de gripes que ocurren anualmente se deben a una cepa de influenza A. Si bien en humanos la infección es respiratoria y su transmisión

es principalmente a través de fómites y aerosoles, en aves se produce una infección generalizada que implica una excreción en el ambiente [241,242]. Si bien la transmisión del virus de la influenza a humanos por este medio no es relevante, las principales masas de agua donde las aves buscan cobijo y alimento pueden servir para detectar la presencia de influenza y colaborar así en el control de su circulación. El poder usar la detección de estos virus en ambientes acuáticos adquiere una mayor importancia si se tiene en consideración que las aves son el principal reservorio del virus de la influenza [243].

Finalmente, otro virus que puede llegar al agua es el virus del Nilo Occidental (WNV). WNV es un miembro de la familia *Flaviviridae*, donde se encuentran otros importantes patógenos humanos como son el virus del dengue o de la hepatitis C, pero también se incluye en el grupo de patógenos conocidos como arbovirus (contracción del término inglés arthropod-borne virus, o virus transmitido por artrópodos) al usar mosquitos del género *Culex* como vector. El principal hospedador del virus son las aves, siendo especialmente importantes aquellos que se encuentran en el orden de los Passeriformes. Éstos son los que contraen una infección en la que el virus prolifera lo suficiente como para que el mosquito al picarles pueda transmitir la enfermedad. Muchas otras aves (como el caso de los Accipitriformes, orden del ave en el que se detectó WNV por primera vez en Cataluña [244]), así como hospedadores fuera de dicha categoría, no producen una viremia lo bastante elevada como para propagar la enfermedad [245].

WNV causa infecciones asintomáticas en el 80% de los casos. Del 20% restante, la gran mayoría cursan con la fiebre del Nilo, que puede durar desde unos pocos días en una forma leve de la enfermedad como provocar una fatiga y debilidad que puede prolongarse hasta varios meses. En aproximadamente 1 de cada 150 casos el virus es capaz de llegar a invadir el sistema neurológico, provocando meningitis o encefalitis que puede llegar a provocar daños que dejen

secuelas. El 10% de los que contraen la forma grave de la enfermedad mueren [245,246].

A pesar de que su vía de transmisión principal no implica un contacto directo con el medio exterior, el virus es capaz de llegar al ambiente a través de varios medios, como pueden ser las plumas de las aves infectadas [247]. También ha sido detectado en los tractos orales y rectales de pájaros enfermos [248]. De la misma forma se han detectado posibles vías de transmisión secundarias; los caimanes se pueden transmitir WNV entre ellos, cosa que permite amplificar la cantidad de virus en el ambiente y que el contagio a otras especies por la vía principal sea más eficaz [249]. Otros estudios apuntan a una posible transmisión hídrica y alimentaria hacia las aves [250]. Afortunadamente el ser humano no es susceptible a contraer el virus a través de agua o alimentos contaminados, pero la presencia de WNV en estas matrices indica una posible infección a las aves de la zona y el consecuente salto al hombre mediante picadas de *Culex*.

2 - OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la optimización de métodos de concentración para responder a las necesidades actuales de detectar tanto virus con cápside desnuda como virus con envuelta, para así poder determinar el perfil virológico de muestras de agua de diversas procedencias.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

1. Optimización del método de concentración por lana de vidrio utilizando HAV como ejemplo de virus desnudo y el coronavirus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) como ejemplo de virus envuelto.
2. Aplicación de la metodología optimizada para detectar patógenos de interés en muestras de agua superficial y de pozos de la zona de Riad, Arabia Saudí.
3. Determinación del perfil virológico de las aguas del estanque de Cal Tet, localizado en el Delta del Llobregat.
4. Estudio de la diversidad poblacional de enterovirus en las aguas residuales de la zona de Barcelona mediante secuenciación masiva a partir del fragmento de la proteína VP1 usada en la caracterización.
5. Caracterización de virus asociados a brotes de transmisión hídrica y determinación de la población mediante secuenciación masiva en caso de ser posible.

3 - INFORME DE LOS **ARTÍCULOS**

3.1 – Artículos publicados y sus factores de impacto

Los artículos que forman parte de la memoria de la Tesis Doctoral presentada por Albert Blanco Ortiz han sido publicados en revistas internacionales de Virología indexadas en el *Journal of Citation Reports*.

Artículo I:

Blanco A, Guix S, Fuster N, Fuentes C, Bartolomé R, Cornejo T, Pintó RM, Bosch A. “Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016”. *Emerg Infect Dis.* 2017 Sep;23(9):1531-1534. doi: 10.3201/eid2309.161489. Publicado en la revista *Emerging Infectious Diseases* en el año 2017. Dicha revista poseía en ese año un factor de impacto de 8.222.

Artículo II:

Blanco A, Abid I, Al-Otaibi N, Pérez-Rodríguez FJ, Fuentes C, Guix S, Pintó RM, Bosch A. "Glass Wool Concentration Optimization for the Detection of Enveloped and Non-enveloped Waterborne Viruses". Food Environ Virol. 2019 Jun;11(2):184-192. doi: 10.1007/s12560-019-09378-0. Publicado en la revista *Food and Environmental Virology* en el año 2019. Dicha revista poseía ese mismo año un factor de impacto de 2.819.

Director y tutor



Dr. Albert Bosch Navarro

Directora



Dra. Rosa Maria Pintó Solé

Barcelona, abril de 2021.

3.2 -Informe de coautoría de los artículos publicados

Artículo I:

Blanco A, Guix S, Fuster N, Fuentes C, Bartolomé R, Cornejo T, Pintó RM, Bosch A. "Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016". Emerg Infect Dis. 2017 Sep;23(9):1531-1534. doi: 10.3201/eid2309.161489.

El trabajo implicado en el artículo I se pudo realizar dentro del marco de los proyectos Food-FP7-311846 de la Unión Europea y XRB-Xarxa de Referència de Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya.

El doctorando se ha encargado de la parte experimental del artículo con la excepción de la secuenciación masiva y la generación de los datos resultantes. En el proceso de concentración de muestras fue ayudado por Noemí Fuster. Se ha encargado también de la interpretación de los datos tanto generados durante la parte experimental como los datos epidemiológicos recibidos del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya.

Ningún coautor ha utilizado el artículo para su tesis doctoral.

Artículo II:

Blanco A, Abid I, Al-Otaibi N, Pérez-Rodríguez FJ, Fuentes C, Guix S, Pintó RM, Bosch A. "Glass Wool Concentration Optimization for the Detection of Enveloped and Non-enveloped Waterborne Viruses". Food Environ Virol. 2019 Jun;11(2):184-192. doi: 10.1007/s12560-019-09378-0.

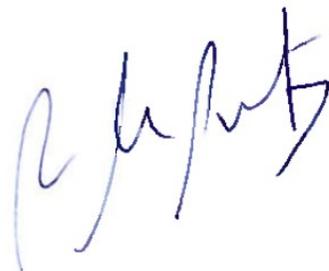
El trabajo implicado en el artículo II se realizó en el marco de los proyectos 12-ENV2528-02 del Plan for Science, Technology and Innovation (MAARIFAH), King Abdulaziz City for Science and Technology, Kingdom of Saudi Arabia, el Food-FP7-311846 de la Unión Europea y XRB-Xarxa de Referència de Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya.

El doctorando, junto con Cristina Fuentes y Francisco Javier Pérez-Rodríguez formaron a Islem Abid en el procedimiento de concentración por lana de vidrio. El grupo de la Dra. Abid recolectó y concentró las muestras para luego enviar el producto resultante a nuestro laboratorio. El resto de la parte experimental del artículo II lo ha llevado a cabo el doctorando.

Ningún coautor ha utilizado el artículo para su tesis doctoral.

Director y tutor

Directora

Dr. Albert Bosch Navarro

Dra. Rosa Maria Pintó Solé

Barcelona, abril de 2021.

3.3 -Informe de manuscritos pendientes de publicación

Junto con los dos artículos mencionados el doctorando ha escrito tres manuscritos que contienen los resultados del resto de la parte experimental de la tesis doctoral. Los borradores son los siguientes:

Manuscrito I: Abid I, Blanco A, Al-Otaibi N, Guix S, Pintó RM, Bosch A. “Dynamic and seasonal distribution of enteric viruses in surface and well water in a desert environment”.

El trabajo implicado en el borrador se pudo realizar dentro del marco de los proyectos 12-ENV2528-02 del Plan for Science, Technology and Innovation (MAARIFAH), King Abdulaziz City for Science and Technology, Kingdom of Saudi Arabia, el Food-FP7-311846 de la Unión Europea y XRB-Xarxa de Referència de Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya.

El contenido del primer manuscrito corresponde al análisis en profundidad de la prevalencia de virus de transmisión fecal oral en aguas del área de Riad, Arabia Saudí, a partir del método de filtración por lana de vidrio descrito en el artículo II.

Ningún coautor ha utilizado el artículo para su tesis doctoral.

Manuscrito II: Blanco A, Guix S, Pintó RM, Bosch A. "From Classic Human Enteric Viruses to Emerging Viruses: the Llobregat Delta Study".

El contenido del borrador se pudo realizar gracias a un convenio con el Consorci per a la Protecció i la Gestió dels Espais Naturals del Delta del Llobregat que permitió el acceso del doctorando a la reserva natural para realizar el muestreo en un área previamente acordada. Asimismo, el análisis de aguas residuales recogidas por Aigües de Barcelona se realizó dentro del marco del proyecto "Detecció i tipat d'enterovirus a partir de mostres d'aigua residual" de la Generalitat de Catalunya.

En el segundo borrador se analiza la presencia tanto de virus entéricos clásicos como virus emergentes detectables en sistemas hídricos en aguas del delta del Llobregat y de entrada de la depuradora del Prat del Llobregat, muy cercana al lugar de muestreo del delta.

Ningún coautor ha utilizado el artículo para su tesis doctoral.

Manuscrito III: Blanco A, Guix S, Garcia-Cehic D, Quer J, Pintó RM, Bosch A. "Enterovirus surveillance in Barcelona wastewater, 2017-2018".

Todo el trabajo experimental descrito en el borrador forma parte de la investigación incluida en el proyecto "Detecció i tipat d'enterovirus a partir de mostres d'aigua residual" de la Generalitat de Catalunya.

Las aguas residuales del Prat del Llobregat ya mencionadas en el borrado II fueron utilizadas también para el seguimiento de la población de los diversos genotipos de enterovirus en el área de Barcelona.

Ningún coautor ha utilizado el artículo para su tesis doctoral.

4 - PUBLICACIONES

4.1 - Capítulo I: **Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016**

Autores: **Albert Blanco**, Susana Guix, Noemí Fuster, Cristina Fuentes, Rosa Bartolomé, Thais Cornejo, Rosa Maria Pintó, Albert Bosch.

Norovirus (NoV) es el principal agente causante de gastroenteritis vírica a nivel mundial. De los siete genogrupos que hay conocidos (GI-GVII) solo NoV GI, NoV GII y NoV GIV comprenden los genotipos capaces de infectar al ser humano. De éstos, el genogrupo II es el más importante en términos epidemiológicos pese a su comportamiento estacional, y su alta incidencia con respecto a los demás genogrupos se debe a la gran variabilidad de genotipos que incluye. En los últimos años el genotipo predominante en gastroenteritis causadas por NoV ha sido el GII.4, habiendo un cambio en la variante predominante cada dos o tres años.

En los últimos años se ha detectado un cambio en la tendencia de NoV GII a nivel mundial, y en varios países NoV GII.4 ha sido sustituido como genotipo mayoritario por NoV GII.17. En abril de 2016 se declaró un brote de gastroenteritis por NoV en Cataluña con 4136 casos detectados asociado a aguas de dispensadores para empresas. En heces de pacientes asociados al brote se detectaron tanto NoV GI como NoV GII. De este último genogrupo se detectó una gran cantidad de gente positiva para NoV GII.17.

El grupo pudo obtener muestras de agua que provenían de una empresa afectada por el brote. Tras analizar el contenido restante de las dos garrafas facilitadas se pudieron detectar altos niveles de genomas tanto de NoV GI como de NoV GII. Asimismo, los resultados se compararon con otras dos muestras de agua obtenidas de una segunda empresa en cuya plantilla no se detectaron casos. Las dos muestras analizadas de dicha empresa resultaron ser negativas para

ambos tipos de NoV. Finalmente, se determinó la presencia de otros virus entéricos en las cuatro muestras de agua, como enterovirus, astrovirus, sapovirus, rotavirus, adenovirus y virus de la hepatitis A. Todas las muestras fueron negativas para dichas dianas.

Los altos niveles de genomas de NoV en las muestras de la empresa afectadas permitieron, por un lado, poder hacer un ensayo con monoazida de propidio (PMA por sus siglas en inglés), y por otro, intentar genotipar los NoV hallados. El ensayo con PMA determinó que las partículas infecciosas correspondían solamente entre un 0.33 y un 5.64% del total de genomas detectados, en función del genogrupo y la muestra, teniendo mayor supervivencia NoV GI. La secuenciación fue difícil, y solo se pudo determinar la presencia de NoV GII.4 en el agua. Posteriormente se hizo una secuenciación masiva de dicha muestra para ver la población de NoV GII de la misma, pero no se detectaron otros genotipos que sí se encontraron en heces de pacientes, como GI.2, GII.2 y el mencionado GII.17. Es posible que los demás genotipos del virus se hallaran en menor concentración en las muestras recibidas, o que éstos se perdieran durante el proceso de concentración hasta llegar a niveles indetectables.

La importancia de los resultados radica en que es la primera vez que se detecta norovirus en agua embotellada, remarcando la importancia de determinar unas normativas de seguridad y de establecer un sistema de análisis de virus en aguas para impedir nuevos brotes en el futuro.

Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016

Albert Blanco,¹ Susana Guix,¹ Noemí Fuster,
Cristina Fuentes, Rosa Bartolomé, Thais Cornejo,
Rosa Maria Pintó, Albert Bosch

In April 2016, an outbreak of gastrointestinal illness (4,136 cases) occurred in Catalonia, Spain. We detected high levels of norovirus genotypes I and II in office water coolers associated with the outbreak. Infectious viral titer estimates were 33–49 genome copies/L for genotype I and 327–660 genome copies/L for genotype II.

During April 11–25, 2016, a total of 4,136 cases of gastroenteritis were reported by the Public Health Agency of Catalonia (ASPCAT; Figure, panel A). A case-patient was defined as an exposed person who had vomiting or diarrhea (3 or more loose stools within 24 hours) and ≥ 2 of the following: nausea, abdominal pain, or fever ($\geq 37.8^\circ\text{C}$). Six patients required hospitalization.

The epidemiologic investigation conducted by the ASPCAT pointed toward an association of the outbreak with drinking bottled spring water from office water coolers; the water had been bottled at a source in Andorra (M. Jané-Checa and A. Martínez-Mateo, Public Health Agency of Catalonia, pers. comm., 2016 Sep 1). Compared with other modes of transmission such as food or person to person, norovirus outbreaks associated with drinking water are rare in developed countries (1). On April 15, 2016, as a precautionary measure, the company producing the bottled water recalled >6,150 containers of water of suspected quality that had already been distributed to 925 companies. The water complied with all requirements of the European Commission directive on the exploitation and marketing of natural mineral waters (2), but these requirements do not include any virologic determination.

The Spanish Authority for Consumption, Food Safety, and Nutrition reported the outbreak at the national (http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/gastroenteritis_agua_envasada.htm) and European (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF, expedient 2017/0469, <https://webgate>.

Author affiliations: University of Barcelona, Barcelona, Spain (A. Blanco, S. Guix, N. Fuster, C. Fuentes, R.M. Pintó, A. Bosch); Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona (R. Bartolomé, T. Cornejo)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2309.161489>

ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2016.0469) levels. The numbers of cases reported by the ASPCAT peaked on April 18 and 21 (Figure, panel B), and the ASPCAT declared the outbreak over on April 25.

The Study

As part of the epidemiologic investigation of this outbreak, we took samples from four 19-L water coolers in 2 offices in the Barcelona metropolitan area, from which affected persons had drunk. We collected samples 1 and 2 on April 15 from 2 water coolers in 1 office, from which 36 cases had been reported. A private company provided samples 3 and 4, from 2 water coolers in a different office with an unknown number of cases, on April 20. We tested all samples immediately upon receipt at our laboratory. We used positively charged glass wool and polyethylene glycol precipitation for virus concentration. Sample volumes ranged from 2.0 L to 7.8 L; we reduced each sample to a final volume of 7 mL, as described previously (3). We extracted total RNA from 0.5 mL of the concentrates with the NucliSens miniMAG magnetic system (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and eluted the samples in 100 μL of elution buffer, following the manufacturer's specifications. We performed a standardized 1-step real-time TaqMan reverse transcription PCR (RT-qPCR; Ultrasense, Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain), in which we used 5 μL of extracted RNA to determine the number of genome copies per liter of human norovirus genogroup I (GI) and genogroup II (GII) (4–7). We monitored virus/nucleic acid extraction and enzyme efficiencies as previously described; we used double-stranded DNA plasmids containing the target sequences as standards (8).

We detected high RNA levels for norovirus GI and GII, around 10^3 and 10^4 genome copies/L, in 2 of the 4 water cooler samples concentrated by glass wool filtration and polyethylene glycol precipitation (Table). Because molecular methods are unable to discern between infectious and noninfectious particles, we predicted the infectivity of norovirus in the concentrated samples by treating the samples with the nucleic acid intercalating dye PMA propidium monoazide; (50 $\mu\text{mol/L}$) and Triton X surfactant (0.5%) before RT-qPCR; this enabled us to distinguish between virions with intact and altered capsids (9). Following this approach, estimated infectious levels in the 2 positive

¹These authors contributed equally to this article.

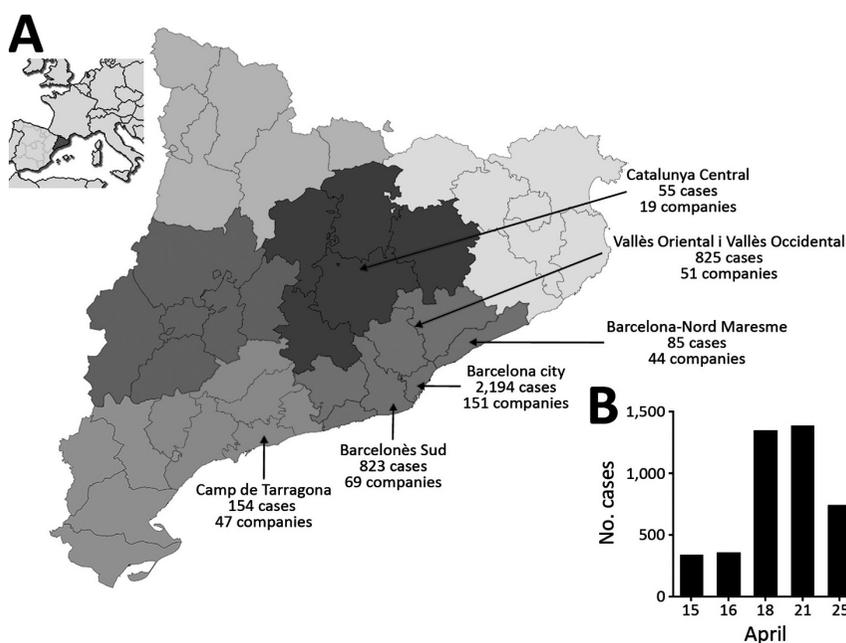


Figure. Waterborne norovirus outbreak in Catalonia, Spain, April 15–25, 2016 (n = 4,136 cases). A) Geographic distribution of the number of cases and affected companies in the Catalan Health regions. Inset shows location of region in Spain. Map outlines obtained from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Catalonia_location_map.svg. B) Time distribution of reported cases. Cases are displayed according to the dates of the press release from the Public Health Agency of Catalonia (http://premsa.gencat.cat/pres_fsvp/AppJava/notapremsaww/292423/ca/salut-publica-dona-tanecat-brot-gastroenteritis-transmes-consum-daigua-enasada.do). Although the onset of the outbreak was on April 11, the first report of cases was on April 15, and the outbreak was declared over on April 25 with a total of 4,136 reported cases, including both primary and secondary cases.

samples were 49 and 327 genome copies/L for norovirus GI and 33 and 660 genome copies/L for norovirus GII (Table).

Given the large number of persons involved in the outbreak and the reported 50% human infectious dose for norovirus of 18–1,300 particles (10,11), the high genome copy values in the water samples were not unexpected. In addition, the proportion of intact (infectious) virions in the water samples, estimated through PMA/Triton treatment before RT-qPCR assays, represented 0.3%–5.6% of the total number of physical particles, which was enough to cause gastrointestinal illness (10,11).

We assayed the presence of enteroviruses, astroviruses, sapoviruses, rotaviruses, adenoviruses, and hepatitis A virus in the 4 water samples by using commercial RT-qPCR kits (Viasure, Certest Biotec SL, Zaragoza, Spain), with negative results. We attempted genotyping of noroviruses in samples 1 and 2 using a semi-nested RT-PCR protocol with specific primers for GI and GII. We performed the first PCR with primers COG1F and G1SKR for GI and COG2F and G2SKR for GII (6,12). For the second PCR, we used primers G1SKF and G1SKR for GI and G2SKF and G2SKR for GII (12). We assigned genotypes based on clustering with reference strains from the sequence database of the European network NoroNet and norovirus genotyping tool (13). We detected a single sequence corresponding to genotype GII.4/Sydney/2012 (GenBank accession no. KX816644) in samples 1 and 2. Additionally, MiSeq next-generation sequence analysis (Illumina, San Diego, CA) of the amplified product

confirmed the sole presence of genotype GII.4/Sydney/2012 (data not shown).

Although some fecal samples from persons who worked at the office from which water samples 1 and 2 were obtained contained genotypes GI.2 (n = 10) and GII.17 (n = 11) but not GII.4/Sydney/2012, we isolated genotypes GII.4/Sydney/2012 (n = 1), GI.2 (n = 1), GII.17 (n = 1), and GII.2 (n = 1) from fecal samples from persons from a different office who exhibited the same gastrointestinal symptoms after drinking water supplied by the same company (data not shown). We hypothesize that the spring water was contaminated by all 4 strains (GI.2, GII.2, GII.4, and GII.17) but levels of viral contamination for each genotype were not homogeneous in all bottled coolers. We may have detected only the GII.4 genotype in water samples 1 and 2 because of a higher concentration of this specific genotype or because of bias caused by the sampling, concentration, and molecular detection procedures. Finally, several reasons could explain why we did not find any GII.4/Sydney/2012 or GII.2 genotypes among the fecal samples from persons from the office that provided samples 1 and 2, including the existence of immune status among the exposed persons or differences in the proportion of infectious/physical particles between the different types.

Conclusions

We describe quantitative detection of norovirus in bottled water. Previously, several brands of mineral water were reported to contain norovirus, but the findings were later

Table. Human norovirus genome copies per liter in analyzed water cooler samples concentrated by glass wool filtration and polyethylene glycol precipitation, metropolitan area of Barcelona, Spain, April 15–20, 2016*

Sample	RT-qPCR		PMA/T	
	GI	GII	GI	GII
1	1.1×10^3	5.8×10^3	49	327
2	1.0×10^4	2.6×10^4	33	660
3	ND	ND	NT	NT
4	ND	ND	NT	NT

*G, genogroup; ND, not detected; NT, not tested; PMA/T, treatment with the nucleic acid intercalating dye propidium monoazide (PMA, 50 $\mu\text{mol/L}$) and Triton X surfactant (0.5%) before RT-qPCR; RT-qPCR, real-time TaqMan reverse transcription PCR.

attributed to laboratory contamination with control reagents (14,15). One limitation of our study is the low number of water samples analyzed. Four days after the onset of the outbreak, the company recalled all batches of water and water coolers of suspected quality, which hampered the collection of a larger number of samples for analysis.

The cause of the water contamination remains to be elucidated. However, the high number of affected persons from 381 offices that received water coolers, and the many different genotypes found in some patients' fecal specimens, point toward sewage pollution of the spring aquifer. Aquifer pollution was acknowledged by the Andorra Ministry of Health and Welfare, and further use of the spring was banned.

This large outbreak suggests that the management of microbial risks of commercially produced mineral waters, universally based solely on bacterial parameters, could benefit from additional analysis for relevant viral pathogens such as norovirus. However, the substantial costs incurred in developing, enhancing, and managing virus surveillance systems call for a balanced approach to keep both the cost and the time required for the analyses within feasibility limits.

Acknowledgments

We are grateful to M. Jané-Checa and A. Martínez-Mateo for providing epidemiological data and useful discussion and to J. Quer and J. Gregori for next-generation sequencing and bioinformatic assistance. We acknowledge the useful collaboration with A. Canals.

This work was supported in part by projects Food-FP7-311846 (European Union) and XRB-Biotechnology Reference Network (Generalitat de Catalunya). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Mr. Blanco is a PhD student at the Department of Genetics, Microbiology, and Statistics of the University of Barcelona in Barcelona, Spain. His research interests include molecular diagnostics and epidemiology of enteric viruses in clinical and environmental samples. Dr. Guix is an associate professor in the Department of Genetics, Microbiology and Statistics of the University of Barcelona, and is a member of the scientific committee of the Spanish Authority for Consumption, Food

Safety, and Nutrition. Her research interests include epidemiology and food safety studies on viruses causing gastrointestinal diseases and hepatitis.

References

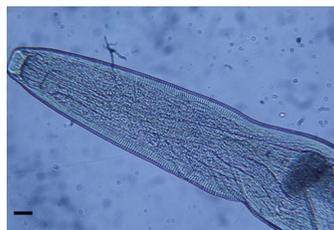
1. Bitler EJ, Matthews JE, Dickey BW, Eisenberg JN, Leon JS. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect.* 2013;141:1563–71. <http://dx.doi.org/10.1017/S095026881300006X>
2. European Union. Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters. Recast. 2662009: L 164. Luxembourg; 2009.
3. Pérez-Sautu U, Sano D, Guix S, Kasimir G, Pintó RM, Bosch A. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environ Microbiol.* 2012;14:494–502. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02642.x>
4. da Silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:7891–7. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01428-07>
5. Svraka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, van der Veer B, Dorresteijn B, et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1389–94. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02305-06>
6. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1548–57. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003>
7. Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods.* 2005;123:1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.023>
8. International Organization for Standardization (ISO). ISO/TS 15216–1:2013. ISO/TS 15216. Microbiology of food and animal feed—Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR. Geneva: The Organization; 2013.
9. Fuster N, Pintó RM, Fuentes C, Beguiristain N, Bosch A, Guix S. Propidium monoazide RT-qPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Res.* 2016;101:226–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.086>
10. Teunis PFM, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 2008;80:1468–76. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21237>
11. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis.* 2014;209:1016–22. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit620>

12. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*. 2002;100:107–14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00404-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00404-9)
13. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011;51:121–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>
14. Beuret C, Kohler D, Lüthi T. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *J Food Prot*. 2000;63:1576–82. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-63.11.1576>
15. Sanchez G, Joosten H, Meyer R, Beuret C. Presence of norovirus sequences in bottled waters is questionable. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:2203–5, author reply 2203–5. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.4.2203-2205.2005>

Address for correspondence: Albert Bosch, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain; email: abosch@ub.edu

December 2012: Zoonotic Infections

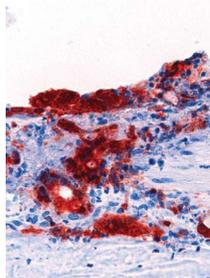
- Farm Animal Contact as Risk Factor for Transmission of Bovine-associated *Salmonella* Subtypes
- Reservoir Competence of Wildlife Host Species for *Babesia microti*
- Outbreak of Influenza A(H3N2) Variant Virus Infection among Attendees of an Agricultural Fair, Pennsylvania, USA, 2011



- Subclinical Influenza Virus A Infections in Pigs Exhibited at Agricultural Fairs, Ohio, 2009–2011
- Diagnostic Assays for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever

- *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* spp. in Bat Ticks, France, 2010
- Nonprimate Hepaciviruses in Domestic Horses, United Kingdom
- Transmission Routes for Nipah Virus from Malaysia and Bangladesh
- Virulent Avian Infectious Bronchitis Virus, People's Republic of China
- Enterovirus 71-associated Hand, Foot, and Mouth Disease, Southern Vietnam, 2011

- Epizootic Spread of Schmallenberg Virus among Wild Cervids, Belgium, Fall 2011
- Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Young Rabbits, Spain
- Reservoir Competence of Vertebrate Hosts for *Anaplasma phagocytophilum*



- MRSA Variant in Companion Animals
- Arctic-like Rabies Virus, Bangladesh
- No Evidence of Prolonged Hendra Virus Shedding by 2 Patients, Australia
- Differentiation of Prions from L-type BSE versus Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease
- Hepatitis E Virus Outbreak in Monkey Facility, Japan
- Group 2 Vaccinia Virus, Brazil
- Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Thailand, 2010–2011



- Cygnet River Virus, a Novel Orthomyxovirus from Ducks, Australia
- High Diversity of RNA Viruses in Rodents, Ethiopia
- West Nile Virus Neurologic Disease in Humans, South Africa
- Antimicrobial Drug-Resistant *Escherichia coli* in Wild Birds and Free-range Poultry, Bangladesh
- Westward Spread of *Echinococcus multilocularis* in Foxes, France, 2005–2010
- *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Bank Voles, France

EMERGING INFECTIOUS DISEASES

<https://wwwnc.cdc.gov/eid/articles/issue/18/12/table-of-contents>

4.2 - Capítulo II: Glass Wool Concentration Optimization for the Detection of Enveloped and Non-enveloped Waterborne Viruses

Autores: **Albert Blanco**, Islem Abid, Nawal Al-Otaibi, Francisco Javier Pérez-Rodríguez, Cristina Fuentes, Susana Guix, Rosa Maria Pintó, Albert Bosch.

Si bien los principales virus entéricos clásicos presentan en el medio ambiente cápsides desnudas, han ido apareciendo y adquiriendo importancia otros patógenos que, si bien no tienen por qué utilizar la vía fecal-oral, tienen la capacidad de alcanzar el sistema hídrico y ser lo tanto detectados en aguas, y de esta manera vigilar su presencia entre la población. Estos últimos presentan cápsides envueltas y esa diferencia en su estructura puede causar que los métodos de concentración actuales no recuperen eficientemente dichos virus.

En nuestro laboratorio se lleva años usando una filtración por lana de vidrio seguida de una concentración secundaria con polietilenglicol (PEG) 6000 para recuperar virus en muestras de agua. Dicho método tiene como principales ventajas su robustez y bajo coste, y su eficiencia de recuperación de virus de cápside desnuda ha sido demostrada en varios estudios anteriores. Utilizando como modelo de virus desnudo el HAV y como virus envuelto el TGEV, se inocularon altos niveles de virus en agua de bebida y describió primeramente la recuperación de virus envueltos con la filtración por lana de vidrio clásica. Al ver que no alcanzaba un 1% de recuperación se decidió modificar el método de forma que se pudiera mejorar la eficiencia para TGEV sin comprometer la de HAV.

Mediante un par de cambios sencillos como son el pH del buffer de elución utilizado tras la filtración, su tiempo de contacto con el filtro de lana de vidrio y el incremento del PEG 6000 del 10 al 20% permitieron no solamente mejorar significativamente la recuperación de TGEV, sino que además también

se mejoró la de HAV. El principal inconveniente del método optimizado es el prolongado contacto de los virus a un pH elevado, cosa que compromete su infectividad, pero dado que la mayoría de virus no son cultivables en laboratorio y se detectan por métodos moleculares, es un inconveniente menor.

Una vez determinada la eficacia del método optimizado en laboratorio, se decidió confirmar su utilidad en muestras reales. En colaboración con el grupo de la Dra. Islem Abid del Botany and Microbiology Department, Science College, King Saud University de Riad, Arabia Saudí, se pudo concentrar y analizar muestras de agua del Wadi Hanifa. El grupo de la Dra. Abid envió al laboratorio concentrados de dichas aguas procesados por el método optimizado de concentración para ser analizados tanto por HAV como por CoV. De las 21 muestras analizadas de septiembre a noviembre de 2015, se pudieron detectar 8 positivas para HAV y una, correspondiente a septiembre, para CoV. Dado que la PCR de CoV utilizada es capaz de detectar genomas de los miembros de los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* se secuenció la muestra positiva para determinar de qué clase de CoV se trataba. La secuenciación reveló que se trataba de un *Alphacoronavirus* de roedor estrechamente relacionado con otras secuencias halladas alrededor del mundo en los últimos años.

Tras los resultados obtenidos se pudo concluir que el método optimizado de filtración por lana de vidrio resultó ser de gran utilidad en muestras crudas, con cambios sencillos y de escaso impacto en el coste del protocolo.



Glass Wool Concentration Optimization for the Detection of Enveloped and Non-enveloped Waterborne Viruses

Albert Blanco^{1,2} · Islem Abid³ · Nawal Al-Otaibi³ · Francisco José Pérez-Rodríguez^{1,2} · Cristina Fuentes^{1,2} · Susana Guix^{1,2} · Rosa M. Pintó^{1,2} · Albert Bosch^{1,2}

Received: 26 July 2018 / Accepted: 13 March 2019 / Published online: 21 March 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

An extremely affordable virus concentration method based on adsorption-elution to glass wool and subsequent reconcentration through polyethylene glycol 6000 (PEG) precipitation was optimized to recover not only non-enveloped viruses but also enveloped viruses. Hepatitis A virus (HAV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV) were employed as surrogates for naked and enveloped viruses, respectively, to set up the methodology. Initial experimentation in small-volume samples showed that both types of particles readily adsorbed to the positively charged glass wool but were poorly detached from it through standard elution with 0.05 M glycine with 3% of beef extract buffer, pH 9.5, with elution efficiencies of 7.2% and 2.6%, for HAV and TGEV, respectively. To improve the recovery of enveloped viruses, several modifications in the elution were assayed: increasing the elution pH, extending glass wool and eluent contact time, adding a detergent, or performing the elution by recirculation or under agitation. Considering practicability and performance, recircularization of the eluent at pH 11.0 for 20 min was the elution procedure of choice, with efficiencies of 25.7% and 18.8% for HAV and TGEV in 50 L of water. Additionally, employing 20% PEG instead of 10% for virus reconcentration improved recoveries up to 47% and 51%, respectively. The optimized procedure was applied to detect naturally occurring HAV and coronaviruses in surface water of Wadi Hanifa, Riyadh. HAV was detected in 38% of the samples, while one sample was positive for an alphacoronavirus. This cheap virus detection system enables the comprehensive surveillance of viruses present in water samples.

Keywords Water concentration · Coronavirus · Hepatitis A virus · Enveloped viruses · Non-enveloped viruses

Introduction

A large variety of pathogenic viruses found in the enteric tract of humans and animals may become environmental contaminants. Despite any virus susceptible to cause an infection after ingestion of water could be considered a

waterborne virus, most reported incidents of waterborne illness are actually related to gastroenteritis or hepatitis. The leading cause of gastroenteritis is norovirus (NoV), implicated in 20% of all cases worldwide, although other viruses such as rotaviruses, astroviruses, adenoviruses and sapoviruses have also been implicated in waterborne transmission of gastroenteritis (Bosch 2007). Regarding hepatitis, hepatitis A virus (HAV) is the foremost agent of acute hepatitis and waterborne hepatitis A outbreaks have been globally reported (Pintó et al. 2010), while hepatitis E virus is an emerging waterborne agent in the developing world, mostly by infection with genotype 1 virus, and much less frequently by genotype 2 virus (Kamar et al. 2014).

All the aforementioned viruses have in common that they occur in the environment as non-enveloped particles, implying a high virion stability (Sanchez and Bosch 2016). Nevertheless, some relevant enveloped pathogenic viruses are documented to be also found in the human gastrointestinal tract, among them coronaviruses (CoV) that cause

Albert Blanco and Islem Abid have contributed equally to this work.

✉ Albert Bosch
abosch@ub.edu

- ¹ Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ² Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ³ Botany and Microbiology Department, Science College, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

serious respiratory diseases such as the severe acute respiratory syndrome or SARS, reported in November 2002, with considerable shedding of the virus in stools (Chu et al. 2005). In fact, the environmental transmission of SARS was reported in a large, private apartment complex (McKinney et al. 2006). Another emerging CoV, the human Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV), initially reported in Saudi Arabia in 2012, is found in the urine and feces of infected animals (Dudas et al. 2018) and in human feces as well (Zhou et al. 2017; Drosten 2013). Other examples of enveloped viruses with potential waterborne spread are avian influenza viruses, such as the highly pathogenic H5N1. Despite their replication is primarily in the respiratory tract, avian influenza viruses induce a generalized infection in birds with actual replication in the gastrointestinal duct with abundant virus shedding in feces (Zhang et al. 2006; Worobey 2008).

CoV and influenza viruses have been reported to survive in the environment long enough to be potentially environmentally transmitted. For instance, both influenza A and B viruses survived for 24–48 h on hard, non-porous surfaces such as stainless steel and plastic but survived for less than 8–12 h on cloth, paper, and tissues (Bean et al. 1982). Studies on the survival of the 2009 H1N1 pandemic virus in water evidenced the capacity of the virus to remain infectious for at least 200 days at 4 °C (Dublineau et al. 2011). Van Doremalen and coworkers (2013) ascertained the stability of MERS-CoV under different environmental conditions. MERS-CoV was more stable at low temperature/low humidity conditions and could still be recovered after 48 h. During aerosolization of MERS-CoV, no decrease in stability was observed at 20 °C and 40% relative humidity. Another study employing infectious animal CoV as surrogates for human CoV pointed to their survival on surfaces for up to 28 days (Casanova et al. 2010).

Since viruses in water occur in very low numbers, processing of large volumes of water is required to concentrate the contaminant viruses in a much smaller final volume susceptible to be analyzed by molecular micro-methods (Ikner et al. 2012; Bosch et al. 2008). If this critical sample concentration step could be applied to concentrate not only non-enveloped viruses but enveloped viruses as well, it would provide a more comprehensive catchall virus detection system allowing a more comprehensive overview of the virome present in environmental water samples.

Positively charged glass wool filtration has been successfully employed for the concentration of non-enveloped viruses from water (Pérez-Sautu et al. 2012; Sano et al. 2011; Blanco et al. 2017). The aim of this study was to develop a procedure based on glass wool filtration for the recovery of enveloped and non-enveloped viruses from large volumes of water. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and HAV were used as models for enveloped and

non-enveloped viruses, respectively, for method optimization. Water from Wadi Hanifa in Riyadh, Saudi Arabia, was sampled for the presence of CoV and HAV following the selected methodology.

Materials and Methods

Viruses and Cells

Monolayers of ST cells (swine testis) were used to propagate the strain PUR46-MAD of the TGEV (Sanchez et al. 1990; Moreno et al. 2008), courtesy of L. Enjuanes and I. Sola, National Center of Biotechnology, Cantoblanco, Madrid). The PUR46-MAD strain of TGEV is attenuated, producing very mild or no enteritis and no mortality in conventional non-colostrum-deprived piglets, and absolutely no pathogenic at all for humans. TGEV was employed as a surrogate for not only human CoV such as MERS-CoV or SARS-CoV, but for generic enveloped viruses as well. ST (swine testis) cells grown in Eagle Minimum Essential Medium (MEM) with 10% fetal bovine serum (FBS) were infected at a multiplicity of infection (m.o.i.) of one, as described elsewhere (Bailey et al. 2004). Infected cell supernatants were collected and kept at –80 °C. Cycles of freeze-thawing were avoided to prevent enveloped particle disruption. High-titer HAV stocks (strain HMI175 43c) were produced in FRhK-4 cell monolayers grown in MEM with 15% inactivated FBS, employing a m.o.i. of 1, and purified after lysing host cell membranes by the addition of a nonionic detergent (1% NP-40) to the infected cell supernatants, as described elsewhere (Costafreda et al. 2014).

Standard Waterborne Virus Concentration

Initially, viruses were concentrated from water by filtration through positively charged glass wool (Ouest Isol, Alizay, France) as described elsewhere (Pérez-Sautu et al. 2012; Lambertini et al. 2008; Kiulia et al. 2010). To monitor the efficiency of virus concentration, TGEV and HAV were seeded at a concentration of 1.15×10^7 and 1.78×10^6 TCID₅₀/L, respectively, in 5-L samples. Two consecutive elutions were performed by backcirculating (5 L/min) through the glass wool 50 mL of 0.05 M glycine with 3% of beef extract buffer (GBE), pH 9.5 with the aid of a peristaltic pump (Millipore XX8200230) and recovering the eluates with the aid of a vacuum pump (Millipore, XX5522050). The resulting 100-mL eluate was further concentrated by 10% polyethylene glycol 6000 (PEG) precipitation (Ueki et al. 2005). The pellet was resuspended in 5 mL of PBS, pH 7.4, and stored at –80 °C.

Optimization of the Concentration for the Recovery of Enveloped Viruses

To improve the recoveries of enveloped viruses obtained with the standard glass wool filtration method, several steps of the elution procedure were modified and the effect of these changes on TGEV recovery ascertained. The tested modifications were: (i) increasing the pH of the elution buffer from 9.5 up to 11.0, (ii) increasing the contact time of the glass wool and the GBE elution buffer from 10 min to overnight (O/N), (iii) adding detergent Tween 80 at a concentration of 0.3% in the elution buffer at pH 11.0 and an O/N contact time, (iv) unpacking the glass wool from the column, mixing it with the elution buffer at pH 11.0 and keeping it under agitation O/N, and (v) recirculating the elution buffer at pH 11.0 through the glass wool column for 1 h with a peristaltic pump (Millipore XX80EL004).

A first set of studies was performed in 5-L volumes, while a second set was performed with 50-L volumes. For virus reconcentration, PEG was employed at 10% and 20% concentrations to precipitate viruses in the eluates. For each procedure, three separate experiments were performed, and in each experiment, three separate replicas were seeded with the appropriate HAV and TGEV concentrations to yield final concentrations in the unconcentrated samples of around 9×10^5 and 6×10^6 TCID₅₀/L, respectively. Virus recoveries were ascertained by quantitative TaqMan Real-Time-PCR (RT-qPCR) assays as described below.

Quantitative Molecular Detection of TGEV Coronavirus

RNA was extracted from 100 μ L-aliquots of TGEV concentrates using the NucliSENS® miniMAG® extraction system (bioMérieux), according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was recovered in 100 μ L of the elution buffer.

A one-step RT-qPCR assay (RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen, Life Technologies) with previously described primers targeting the S gene of the virus genome (Vemulapalli et al. 2009) was employed for quantitative TGEV detection. The final volume of reaction mixture was 25 μ L, containing 0.4 μ M of forward primer (5'-TCTGCTGAAGGTGCTATTATATGC-3'), 1.2 μ M of reverse primer (5'-CCACAATTTGCCCTCTGAA TTAGAAG-3'), 0.3 μ M of probe (5'-FAM-C/TAAGGGCTC ACCACTACTACCACCA-BHQ3') and 5 μ L of extracted RNA. The amplification parameters were as follows: reverse transcription at 50 °C for 30 min followed by denaturation at 95 °C for 15 min. Then, 50 cycles of amplification were performed with each cycle, including denaturation at 94 °C for 15 s, annealing for 30 s at 56 °C and extension for 15 s at 72 °C.

Molecular Detection of Wild-Type CoV

A semi-nested TaqMan RT-PCR with previously described primers (Gouilh et al. 2011), targeting a conserved region of the RNA-dependent RNA-polymerase gene, was employed for the broad detection of wild-type alpha and beta CoV. The first PCR produces a 438-bp amplicon, whereas the nested one produces a 216-bp amplicon. Primer sequences were as follows: Primer reverse: 5'-CCATCRTCMGAHARAATC ATCATA-3'; Primer forward: 5'-GGTTGGGAYTAYCCW AARTGTGA-3'; Primer forward (2nd PCR): 5'-GCNAAT-WSTGTNTTTAACAT-3'. Briefly, the RT mix contained 200 μ M of dNTPs, 0.5 μ M of reverse primer and 5 μ L of RNA, using a final volume of 25 μ L. The PCR and the semi-nested PCR mix contained 200 μ M of dNTPs, 1 μ M of both forward and reverse primer and 10 μ L of the reverse transcription product. The final volume of the PCR and the semi-nested PCR mix was 50 μ L.

The amplification parameters were as follows: reverse transcription ran during 60 min at 42 °C. The first PCR had a denaturation period of 95 °C for 3 min. Then, 30 cycles of amplification were performed with each cycle containing denaturation at 95 °C for 30 s, annealing for 60 s at 50 °C and extension for 90 s at 72 °C. There was a final elongation period of 7 min at 72 °C. The second PCR had the same program as the first, but the elongation period run at 54 °C for 60 s.

Quantitative Molecular Detection of HAV

HAV quantification was performed through a standardized one-step real-time TaqMan RT-qPCR (RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen, Life Technologies) with primers HAV240 and HAV68, probe HAV150(-) labeled at the 5' with 6-carboxyfluorescein (FAM) and modified at the 3' with the addition of a minor groove binder (MGB), and assay conditions described elsewhere (Costafreda et al. 2006) and specified in the ISO 15216-1:2017 standard for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-qPCR (International Organization for Standardization - ISO 2017).

Water Samples

The collection of samples for field studies was carried out based according to ISO 19458:2006 (International Organization for Standardization - ISO 2006) for the collection of water samples for microbiological analysis. Seven 10-L water samples were collected monthly from September to November 2015, from strategic sampling locations along the main channel of Wadi Hanifa in the Nejd region, Riyadh Province, in central Saudi Arabia. Samples were stored for a maximum of 24 h at 4 °C before being processed. Minimum

and maximum temperature, conductivity and pH readings were 25–30 °C, 2604–5803 $\mu\text{S}/\text{cm}$, and 7.4–7.8, respectively. Total and fecal coliform counts (CFU) per 100 mL ranged from 1.5×10^4 to 1.7×10^5 and from 2.5×10^3 to 9.1×10^4 , respectively.

Sequencing

Since our CoV RT-PCR detects all CoV belonging to either the alphacoronavirus or the betacoronavirus group, sequencing was necessary to characterize the positive samples. The DNA was sequenced using both forward and reverse primers using the thermo Sequenase Big Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit (Amersham Pharmacia Biotech) on an automated sequencer (ABI PRISM 310). The nucleotide sequence was submitted to GenBank (accession number: KY565343).

Phylogenetic analysis was performed using the neighbor-joining method (distance calculation by the Kimura-2-parameter correction; pairwise deletion) implemented in the MEGA7 program (Kumar et al. 2016), and results were validated by 1000 bootstrap replicates. Genotypes were assigned based on clustering with reference strains in the phylogenetic tree with >70% bootstrap support.

Statistical Analysis

Data were ascertained to be normally distributed. Comparisons between means were performed using the student t test (unpaired) using the IBM SPSS Statistics version 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Method Optimization for Enveloped and Non-enveloped Virus Concentration from Water Through Glass Wool Filtration

Table 1 depicts the recoveries of TGEV and HAV genome copies in the concentrates from 5-L samples. Initially, the standard glass wool filtration method, consisting of an adsorption to the positively charged glass wool matrix and subsequent elution with GBE buffer at pH, 9.5 after 10 min of contact, was employed. By this procedure, both viruses efficiently adsorbed onto the glass wool, with mean attachment efficiencies of 57.1% and 52.1%, for TGEV and HAV, respectively, but then were poorly eluted from it, with recoveries of 2.6% and 7.2% for TGEV and HAV, respectively.

The elution efficiency dramatically increased when the pH of the eluent was raised to 11.0, irrespectively of other details of the procedure such as eluent contact time or the presence of Tween 80 (Table 1). In consequence, different elution procedures, all performed at pH 11.0, were assayed for the concentration of HAV and TGEV seeded in large-volume samples, such as 50-L water samples (Table 2). Addition of Tween 80 hampers the recovery of TGEV, likely because of the presence of a lipid-containing envelope in the virion that is damaged by the detergent. Extending the elution time to overnight, or performing the elution under agitation or recircularization provided better efficiencies of recovery for both viruses. Considering both practicability and performance, recircularization of the eluent at pH 11.0 for 20 min was the elution procedure of choice. The mean adsorption efficiencies for TGEV and HAV in 50 L of water were of 62% and 34% for TGEV and HAV, respectively.

PEG is widely employed for virus reconcentration from the eluates at a 10% concentration. By simply increasing the concentration of PEG from 10 to 20%, a significant ($p < 0.01$) improvement in the efficiency of this

Table 1 Percent recoveries of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and hepatitis A virus (HAV) seeded in 5-L surface water samples employing adsorption onto glass wool and different elution procedures

Elution	Virus			
	TGEV		HAV	
	Adsorption	Elution	Adsorption	Elution
pH 9.5; 10 min ^a	71.6	2.6	59.6	7.2
pH 11.0; 10 min	51.4	28.8	50.2	33.1
pH 11.0; O/N	62.9	37.4	52.8	34.3
pH 11.0+ Tween 80 0.3%; O/N	42.7	100.0	45.6	86.7
Average adsorption (mean \pm SE)	57.1 \pm 6.3	–	52.1 \pm 2.9	–

The composition of the elution buffer was 0.05 M glycine with 3% of beef extract

O/N overnight, SE standard error

^aStandard elution procedure

Table 2 Percent recoveries of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and hepatitis A virus (HAV) seeded in 50-L surface water samples employing adsorption onto glass wool and different elution procedures

Elution	Virus			
	TGEV		HAV	
	Adsorption	Elution	Adsorption	Elution
pH 11.0; O/N	73.8	2.9	44.1	6.8
pH 11.0+Tween 80; O/N	64.3	0.4	41.9	22.6
pH 11.0; agitation, O/N	50.1	10.4	23.2	23.3
pH 11.0; recirculation 20 min	59.2	18.0	27.1	23.9
Average adsorption (mean ± SE)	61.9 ± 9.9		34.1 ± 10.5	

The composition of the elution buffer was 0.05 M glycine with 3% of beef extract
O/N overnight, SE standard error

reconcentration step was observed. In this way, the efficiencies of recovery of TGEV and HAV increased from $30.8 \pm 14.7\%$ to $51.3 \pm 10.5\%$ and from $30.2 \pm 8.1\%$ to $47.2 \pm 5.7\%$, respectively (data not shown). Twenty percent PEG was employed thereafter as reconcentration procedure in the optimized concentration method.

Table 3 shows the efficiency of the different steps that compose the optimized concentration procedure for the detection of non-enveloped and enveloped viruses in large water volumes. TGEV was more efficiently ($p < 0.05$) adsorbed onto the glass wool than HAV (62.8 vs 34.1%); however, HAV was more readily eluted from the matrix than TGEV (25.7 vs 18.8%), although this difference was not statistically significant. The efficiencies of virus precipitation by 20% PEG did not significantly differ among the enveloped and non-enveloped viruses: 41.9% for TGEV and 49.8% for HAV. Altogether, the overall concentration efficiencies for TGEV and HAV were in the same range: 5.1% and 4.5% for TGEV and HAV, respectively. These recoveries for the enveloped and non-enveloped virus models

were significantly ($p < 0.005$) improved compared to those obtained employing the standard glass wool adsorption-elution procedure: 0.4% and 1.4% for TGEV and HAV, respectively (Table 3).

Molecular Detection of HAV and CoV in Environmental Samples from Saudi Arabia

The optimized glass wool concentration procedure was applied for the detection of CoV and HAV naturally occurring in the surface water of Wadi Hanifa. Only one sample (Table 4) was positive by semi-nested RT-PCR for wild-type alpha/beta CoV. Sequence analysis evidenced that the CoV isolate was closely related to a novel rodent/shrew-specific clade within lineage A of genus *Alphacoronavirus*, reported in Asia and Europe, whose prototypic member is the recently described Lucheng virus found in China (Wang et al. 2015; Tsoleridis et al. 2016) (Fig. 1).

A standardized one-step RT-qPCR assay was employed for the quantitative detection of HAV in Wadi Hanifa

Table 3 Percent recoveries of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and hepatitis A virus (HAV) seeded in 50-L surface water samples employing the optimized concentration procedure

Concentration step	Virus recoveries	
	TGEV (mean ± SD)	HAV (mean ± SD)
Adsorption to glass wool	$62.8 \pm 3.5\%$ ($3.6 \times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$)	$34.1 \pm 3.6\%$ ($3.0 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^4$)
Elution from glass wool	$18.8 \pm 2.2\%$ ($6.8 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$)	$25.7 \pm 3.5\%$ ($7.8 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^4$)
Adsorption + Elution	$11.8 \pm 2.1\%$	$8.8 \pm 2.2\%$
PEG precipitation	$41.9 \pm 6.5\%$ ($2.8 \times 10^5 \pm 8.9 \times 10^4$)	$49.8 \pm 7.2\%$ ($3.8 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^4$)
Overall recovery	$5.1 \pm 1.4\%$	$4.5 \pm 1.5\%$
Recovery by standard procedure	0.40%	1.4%

Mean TGEV and HAV concentrations in the initial unconcentrated samples were $5.7 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$, and $8.9 \times 10^5 \pm 5.0 \times 10^5$ TCID₅₀/L, respectively. Viruses were eluted by recirculating for 20 min 0.05 M glycine buffer with 3% of beef extract at pH 11.0, and further reconcentrated by precipitation with 20% polyethylene glycol 6000 (PEG). Mean virus titers (TCID₅₀/L) recovered at each concentration step are shown in brackets

Table 4 Detection of naturally occurring coronaviruses (CoV) and hepatitis A virus (HAV) in surface water samples from Wadi Hanifa, Saudi Arabia (Sep–Nov, 2015)

Month	CoV positivity	HAV positivity	HAV Genome copies/L (mean ± SD)	HAV genome copies/L (Range)
Sep 2015	1/7 (14%)	5/7 (71%)	9.5 × 10 ² ± 7.3 × 10 ³	7.1 × 10 ¹ –1.9 × 10 ⁴
Oct 2015	0/7 (0%)	1/7 (14%)	5.0 × 10 ¹ ± 0.0	5.0 × 10 ¹
Nov 2015	0/7 (0%)	2/7 (29%)	8.4 × 10 ³ ± 5.9 × 10 ²	4.4 × 10 ² –1.6 × 10 ³
Total	1/21 (5%)	8/21 (38%)	3.5 × 10 ³ ± 6.2 × 10 ³	5.0 × 10 ¹ –1.9 × 10 ⁴



Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree of coronaviruses based on a conserved region of the RNA-dependent RNA-polymerase gene. Phylogenetic distances are expressed as the expected number of substitutions per nucleotide site and can be estimated using the scale. The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of boot-

strap support (of 1000 replicates) for the clusters to the right of the node. Only bootstrap values above 70% are shown. Bold type indicates the alpha coronavirus sequence obtained in this study (accession number: KY565343.1)

waters (Table 4). HAV was detected in 38% of the samples (8/21), and the highest positivity rate (71%, 5/7) was observed in September. The mean genome copy number in the surface water was $3.5 \times 10^3/\text{L}$, ranging from $5.0 \times 10^1/\text{L}$ to $1.9 \times 10^4/\text{L}$.

Discussion

The surveillance of the virological quality of water provides relevant inputs on the public health impact of waterborne viruses, among them, the incidence and behavior of viruses in the water environment, the assessment of the risk of infection posed by these waterborne viruses, or the efficiency of water treatments for virus removal/inactivation. Last but not least, characterization of the strains isolated from the water environment supplies valuable environmental epidemiology data that may provide a comprehensive overview of all viruses circulating in the community, encompassing not only viral agents causing symptomatic infections but also those that cause asymptomatic infections that otherwise remain unnoticed.

Positively charged oil-coated sodocalcic glass wool is a low-cost alternative for the concentration of different types of viruses in water without requiring any preconditioning of the sample (Gantzer et al. 1997; Lambertini et al. 2008; Kiulia et al. 2010; Sano et al. 2011; Pérez-Sautu et al. 2012; Blanco et al. 2017). Upon autoclaving, used glass wool may be readily disposed as recyclable waste. However, in our hands, the standard glass wool concentration method does not perform well for enveloped viruses and hence we adapted the procedure to concentrate enveloped viruses without dampening the recoveries of non-enveloped virus particles that remain the usual targets in environmental surveillance studies. By modifying the elution conditions, the recoveries of both types of viruses after glass wool concentration were dramatically improved, increasing from 7.2% and 2.6–25.7% and 18.8%, for non-enveloped and enveloped viruses, respectively. An additional improvement in the virus concentration efficiencies was observed doubling the concentration of PEG, from 10 to 20%, to perform the precipitation employed for virus reconcentration. In this way, 20% PEG provided increases in the recovery of non-enveloped and enveloped viruses of up to 56.3% and 66.6%, respectively, compared to 10% PEG (data not shown).

The choice of PEG precipitation over other possible reconcentration options was also based on the affordability of the procedure in order to keep the cost of the entire virus concentration, i.e., glass wool adsorption/elution and PEG reconcentration, low enough (below 15 euro per sample) to be applicable for environmental surveillance studies performed in developing areas.

Current ISO standards for the molecular detection of viruses in water and food specify a threshold of acceptance of virus recovering efficiencies above 1% (International Organization for Standardization - ISO 2017; Lowther et al. 2017). This criterion is met for the recovery of non-enveloped and enveloped viruses from large volumes (50 L) of water employing glass wool filtration and PEG precipitation: 4.5% and 5.1%, respectively. The combined adsorption-elution concentration steps provided recoveries of 8.8% and 11.8%, respectively, for non-enveloped and enveloped viruses, from 50-L samples.

The optimized concentration methodology was applied for the detection of wild-type HAV, and alpha and beta CoV, naturally occurring in the waters of the main channel of Wadi Hanifa, a valley running for 120 km from northwest to southeast, with several small-medium size towns, that crosses the city of Riyadh. HAV was detected in 38% of the samples (8/21), while only one sample came out positive for a rat CoV belonging to lineage A of genus *Alphacoronavirus*, closely related to a CoV reported in European rats (Tsoleridis et al. 2016) that, together with the Lucheng virus described in China, form a distinct rodent/shrew-specific clade (Wang et al. 2015; Ge et al. 2017). The sole remit of the limited survey performed in Riyadh surface waters was to ascertain the validity of the concentration procedure for the comprehensive monitoring of the presence of non-enveloped and enveloped viruses in the environment. Noteworthy, the same methodology has enabled the very recent detection of alpha CoV, phylogenetically related to the one detected in Wadi Hanifa, in water samples from the metropolitan area of Barcelona (data not shown). No data exist on the potential zoonotic transmission of rodent CoV to humans.

At the end of June 2018, the burden of MERS in Saudi Arabia was 1853 laboratory-confirmed cases, including 717 related deaths with a case–fatality rate of 38.7% (WHO 2018). Although several CoV may be spread through the fecal-oral route, the potential waterborne transmission of MERS-CoV or SARS-CoV remains unlikely, despite the considerable shedding of both viruses in human stool (Chu et al. 2005; Drosten 2013) and, in the case of MERS-CoV, in camel stool too (Dudas et al. 2018). Nevertheless, there is evidence that environmental factors played an important role in the rapid spread of SARS infection throughout a large, private apartment complex (McKinney et al. 2006) and that the human gut may serve as an alternative infection route for MERS-CoV (Zhou et al. 2017).

Activities involving manipulation of samples potentially carrying MERS-CoV, SARS-CoV or other emerging agents may require BSL-3 facilities (CDC 2017). Raising the pH of the eluent employed in the glass wool virus concentration provided the dual benefit of significantly increasing virus recoveries for all types of viruses

and, concomitantly, of greatly reducing virus infectivity, hence avoiding the need to work in sophisticated BSL-3 facilities.

Conclusions

A cheap and robust virus concentration procedure based on adsorption/elution onto glass wool and PEG precipitation that enables the comprehensive surveillance of viruses in large volumes of water has been developed. The methodology is able to concentrate non-enveloped as well as enveloped virus particles, opening the possibility to survey the presence in the environment of some health-significant enveloped viruses, such as MERS or SARS CoV, avian influenza virus, Nipah virus or Tick-borne encephalitis virus, among others. Although the waterborne transmission of these agents, if any, is negligible, their presence in the environment is indicative of their spread and prevalence among their human or animal hosts, even in the absence of symptomatic cases.

The affordability of the developed methodology makes it adequate for surveillance studies performed in low-income parts of the world.

Acknowledgements This project was funded in part by the National Plan for Science, Technology and Innovation (MAARIFAH), King Abdulaziz City for Science and Technology, Kingdom of Saudi Arabia, Award number (12-ENV2528-02), Food-FP7-311846 (European Union) and XRB-Biotechnology Reference Network (Generalitat de Catalunya). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bailey, M., Haverson, K., Miller, B., Jones, P., Sola, I., Enjuanes, L., et al. (2004). Effects of infection with transmissible gastroenteritis virus on concomitant immune responses to dietary and injected antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *11*(2), 337–343.
- Bean, B., Moore, B. M., Sterner, B., Peterson, L. R., Gerding, D. N., & Balfour, H. H. Jr. (1982). Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*, *146*(1), 47–51.
- Blanco, A., Guix, S., Fuster, N., Fuentes, C., Bartolome, R., Cornejo, T., et al. (2017). Norovirus in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(9), 1531–1534. <https://doi.org/10.3201/eid2309.161489>.
- Bosch, A. (2007). *Human viruses in water. Perspectives in medical virology* (Vol. 17, 1st ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Bosch, A., Guix, S., Sano, D., & Pinto, R. M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(3), 295–301.
- Casanova, L. M., Jeon, S., Rutala, W. A., Weber, D. J., & Sobsey, M. D. (2010). Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(9), 2712–2717.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2017). Interim laboratory biosafety guidelines for handling and processing specimens associated with middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)—Version 2. <https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/guidelines-lab-biosafety.html>.
- Chu, C. M., Cheng, V. C. C., Hung, I. F. N., Chan, K. S., Tang, B. S. F., Tsang, T. H. F., et al. (2005). Viral load distribution in SARS outbreak. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(12), 1882–1886.
- Costafreda, M. I., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a real-time taqman reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(6), 3846–3855.
- Costafreda, M. I., Pérez-Rodríguez, F. J., D'Andrea, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., et al. (2014). Hepatitis A virus adaptation to cellular shut-off is driven by dynamic adjustments of codon usage and results in the selection of populations with altered capsids. *Journal of Virology*, *88*(9), 5029–5041. <https://doi.org/10.1128/jvi.00087-14>.
- Drosten, C. (2013). Is MERS another SARS? *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(9), 727–728. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70159-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70159-2) [pii].
- Dublineau, A., Batéjat, C., Pinon, A., Burguière, A. M., Leclercq, I., & Manuguerra, J.-C. (2011). Persistence of the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) virus in water and on non-porous surface. *PLoS ONE*, *6*(11), e28043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028043>.
- Dudas, G., Carvalho, L. M., Rambaut, A., & Bedford, T. (2018). MERS-CoV spillover at the camel-human interface. *Elife*, *7*, e31257. <https://doi.org/10.7554/eLife.31257>.
- Gantzer, C., Senouci, S., Maul, A., Levi, Y., & Schwartzbrod, L. (1997). Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, *65*(2), 265–271.
- Ge, X.-Y., Yang, W.-H., Zhou, J.-H., Li, B., Zhang, W., Shi, Z.-L., et al. (2017). Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China. *Virology Journal*, *14*(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0766-9>.
- Gouilh, M. A., Puechmaile, S. J., Gonzalez, J.-P., Teeling, E., Kit-tayapong, P., & Manuguerra, J.-C. (2011). SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(7), 1690–1702. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.021>.
- Ikner, L. A., Gerba, C. P., & Bright, K. R. (2012). Concentration and recovery of viruses from water: A comprehensive review. *Food and Environmental Virology*, *4*(2), 41–67. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>.
- International Organization for Standardization - ISO, Geneva. (2006). Water quality -- Sampling for microbiological analysis. ISO 19458:2006 (pp. 18).
- International Organization for Standardization - ISO, Geneva. (2017). Microbiology of the food chain – horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR – Part 1: method for quantification. ISO 15216-1:2017. (pp. 31).
- Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F., & Izopet, J. (2014). Hepatitis E virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(1), 116–138. <https://doi.org/10.1128/cmr.00057-13>.
- Kiulia, N. M., Netshikweta, R., Page, N. A., van Zyl, W. B., Kiraithe, M. M., Nyachico, A., et al. (2010). The detection of enteric

- viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 818–828.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> [pii].
- Lambertini, E., Spencer, S. K., Bertz, P. D., Loge, F. J., Kieke, B. A., & Borchardt, M. A. (2008). Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 2990–2996.
- Lowther, J. A., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Mäde, D., Rutjes, S. A., et al. (2017). Validation of ISO method 15216 part 1 – Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.014>.
- McKinney, K. R., Gong, Y. Y., & Lewis, T. G. (2006). Environmental transmission of SARS at Amoy Gardens. *Journal of Environmental Health*, 68(9), 26.
- Moreno, J. L., Zuniga, S., Enjuanes, L., & Sola, I. (2008). Identification of a coronavirus transcription enhancer. *Journal of Virology*, 82(8), 3882–3893. <https://doi.org/10.1128/JVI.02622-07> JVI.02622-07%5Bpii%5D.
- Pérez-Sautu, U., Sano, D., Guix, S., Kasimir, G., Pintó, R. M., & Bosch, A. (2012). Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environmental Microbiology*, 14(2), 494–502. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02642.x>.
- Pintó, R. M., Costafreda, M. I., Perez Rodriguez, F. J., D'Andrea, L., & Bosch, A. (2010). Hepatitis A virus: State of the art. *Food and Environmental Virology*, 2(3), 127–135.
- Sanchez, C. M., Jimenez, G., Laviada, M. D., Correa, I., Sune, C., Bulido, M., et al. (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, 174(2), 410–417.
- Sanchez, G., & Bosch, A. (2016). Survival of enteric viruses in the environment and food. In S. M. C. Goyal, J.L.; (Ed.), *Viruses in foods*. *Food Microbiology* (2 edn., pp. 367–392). New York: Springer.
- Sano, D., Perez-Sautu, U., Guix, S., Pinto, R. M., Miura, T., Okabe, S., et al. (2011). Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat River Catchment, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1111–1114.
- Tsoleridis, T., Onianwa, O., Horncastle, E., Dayman, E., Zhu, M., Danjitrong, T., et al. (2016). Discovery of Novel Alphacoronaviruses in European Rodents and Shrews. *Viruses*, 8(3), 84. <https://doi.org/10.3390/v8030084>.
- Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K., & Omura, T. (2005). Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Research*, 39(18), 4271–4280. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.035>. pii].
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., & Munster, V. J. (2013). Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *EuroSurveillance*, 18(38), 20590.
- Venulapalli, R., Gulani, J., & Santrich, C. (2009). A real-time TaqMan RT-PCR assay with an internal amplification control for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus in swine fecal samples. *Journal of Virological Methods*, 162(1–2), 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.016> S0166-0934(09)00393-0%5Bpii%5D.
- Wang, W., Lin, X.-D., Guo, W.-P., Zhou, R.-H., Wang, M.-R., Wang, C.-Q., et al. (2015). Discovery, diversity and evolution of novel coronaviruses sampled from rodents in China. *Virology*, 474, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.10.017>.
- WHO, World Health Organization (2018). MERS situation update. <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-june-2018.html>.
- Worobey, M. (2008). Phylogenetic evidence against evolutionary stasis and natural abiotic reservoirs of influenza A virus. *The Journal of Virology*, 82(7), 3769–3774.
- Zhang, G., Shoham, D., Gilichinsky, D., Davydov, S., Castello, J. D., & Rogers, S. O. (2006). Evidence of influenza A virus RNA in Siberian lake ice. *Journal of Virology*, 80(24), 12229–12235.
- Zhou, J., Li, C., Zhao, G., Chu, H., Wang, D., Yan, H. H.-N., et al. (2017). Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Science Advances*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4966>.

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

4.3 - Capítulo III: Dynamic and seasonal distribution of enteric viruses in surface and well water in a desert environment

Autores: Islem Abid, **Albert Blanco**, Nawal Al-Otaibi, Susana Guix, Rosa Maria Pintó, Albert Bosch.

El área de Riad, Arabia Saudí, representa un ambiente de gran interés en el campo de la virología ambiental. Al poseer un ambiente árido con escasas precipitaciones y temperaturas extremas en los meses de verano, el agua es un bien escaso y preciado. La astringencia de dicho recurso ha ido incrementando debido al explosivo aumento demográfico de la zona, pasando en sesenta años de 150.000 habitantes a cerca de 5 millones.

La mayor parte del aporte hídrico de la zona llega al Wadi Hanifa, un área fluvial que permanece mayormente seco hasta que llega la estación lluviosa, en la cual pueden ocurrir inundaciones. En el resto del año el agua llega por las anecdóticas precipitaciones y especialmente por una depuradora de aguas residuales. Una fracción de dicha agua se filtra a través del suelo hasta pozos circundantes. Siendo Arabia Saudí un área endémica para HAV, estudiar el perfil virológico tanto del agua de Wadi Hanifa como de los pozos puede ofrecer información valiosa sobre la prevalencia y supervivencia de virus entéricos en ambientes desérticos.

Mediante el método optimizado de filtración por lana de vidrio se concentraron y posteriormente analizaron 156 muestras de agua - 84 de las cuales del Wadi Hanifa y 72 de pozos - en el período comprendido de diciembre de 2014 a noviembre de 2015. Se determinó la presencia de NoV GI, NoV GII, HAV y HEV, y posteriormente se cuantificaron las muestras positivas para cualquiera de dichos virus.

Los resultados mostraron una clara persistencia de NoV GII en las muestras de agua providentes del Wadi Hanifa y escasa presencia en pozos. La prevalencia de NoV GI y HAV en aguas superficiales se alternan, con un pico de incidencia de NoV GI en la primera mitad del año y con el máximo de positivos de HAV a partir de julio. Este efecto es todavía más evidente en las aguas de pozo. Tomando como referencia el inicio de la época de lluvias en octubre se puede ver que tanto HAV como NoV GI ven drásticamente reducida su presencia en las aguas de Arabia Saudí, ya sea en superficie o en pozos. NoV GII mantiene, pese a las inundaciones que se dieron en 2015 en la estación húmeda, prevalencias similares a las del resto del año. HEV solo se ha encontrado en dos muestras de septiembre y noviembre.

Si nos centramos en las cuantificaciones, en todos los virus hay una mayor carga vírica en aguas superficiales, si bien la diferencia entre los títulos de HAV en aguas superficiales y de pozo es menor a la encontrada en NoV GI y GII. En estos casos se han detectado muestras de agua superficial con más de 10.000 gc/L, mientras que en aguas de pozo apenas llegaban a las 100 gc/L. Otra particularidad de HAV respecto a NoV es que la carga vírica en aguas fluctúa más. Al igual que con la prevalencia, se encuentra los mayores títulos de NoV se alcanzan en la primera mitad del año, y a partir de julio se detectan las cargas máximas de HAV.

Pese a las limitaciones de haber muestreado solo durante un año el estudio es relevante por ser el primero en analizar en profundidad la presencia de virus de transmisión fecal-oral en el medio acuático de Arabia Saudí.

1 **Dynamic and seasonal distribution of enteric**
2 **viruses in surface and well water in a desert**
3 **environment**

4
5 **Islem Abid^{1*}, Albert Blanco^{2,3*}, Nawal Al-Otaibi¹, Susana Guix^{2,3},**
6 **Rosa M. Pintó^{2,3}, Albert Bosch^{2,3+}**

7
8
9
10
11
12
13 ¹ Botany and Microbiology Department, Science College, King Saud University, Riyadh,
14 Saudi Arabia.

15 ² Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics,
16 University of Barcelona, Barcelona, Spain.

17 ³ Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

18
19 **Keywords:** Saudi Arabia, Hepatitis A, Norovirus, Water research.
20
21
22
23
24
25

26 *Equally contributed

27 ⁺ **Corresponding author:**

28 Albert Bosch, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, Diagonal
29 645, 08028, Barcelona, Spain. Tel (34) 934034620; Fax (34) 934034629; email:
30 abosch@ub.edu
31
32
33

34 **Highlights:**

- 35 • NoV had higher prevalence and loads in surface water than well water, HAV
36 did not follow this pattern.
- 37 • HAV had higher titers when NoV viral loads were low and viceversa.
- 38 • HAV was detected in wells almost all the year, NoV mostly from December to
39 April.
- 40 • HEV was detected in two well water samples with similar levels, in May and
41 November.

42

43 **Abstract**

44 Enteric viruses are the major cause of gastroenteritis worldwide, but in some areas like
45 Saudi Arabia there is no information about their presence in water sources. Having
46 information about children stool samples is not enough to know their real prevalence.
47 The aim of the study was to gather information about the presence of enteric viruses in
48 water for the first time in Saudi Arabia. For this purpose, thirteen monthly samples from
49 December 2014 to November 2015 were collected in Wadi Hanifa and surrounding wells.
50 Hepatitis A virus and E viruses, and noroviruses GI and GII were detected and quantified
51 by molecular methods after concentration employing an optimized glass wool filtration
52 method. Despite hepatitis E findings were anecdotic, our results highlights interesting
53 features about the other three viruses. There was a higher prevalence of norovirus in Wadi
54 Hanifa samples than in well water samples (46.43% and 12.5%, respectively, for
55 norovirus GI, and 66.67% and 8.33% respectively for norovirus GII), and similar levels
56 of hepatitis A positivity (40.48% in surface water vs 43.06% in well water). Also, a strong
57 correlation with flooding events for HAV and NoV GI were observed in both types of
58 water and surface water samples, respectively, being NoV GII apparently not affected.
59 Finally, quantifications showed a duality between norovirus and hepatitis A.

60

61 **1 - Introduction**

62 Enteric viruses, the major cause of acute gastroenteritis worldwide, are also one
63 of the most important waterborne pathogens (Ganesh and Lin, 2013). Despite their
64 divergence in pathogenesis and life cycle, all of them are transmitted by the fecal-oral
65 route, through both food and water contamination. They spread in the environment
66 mostly as non-enveloped particles, making them resistant to unfavorable conditions and
67 can persist for extended periods. Their infectious dose is low (Atmar et al., 2014) and,
68 combined with the extremely high excretion of up to 10^8 - 10^{11} gc/gr (Bosch et al., 2016),
69 enteric viruses are capable to produce large outbreaks. The most important viruses in this
70 group can be divided in enterotropic and hepatotropic viruses, being norovirus (NoV)
71 and hepatitis A virus (HAV) the best known and characterized of each category.

72 NoV is the causal agent of approximately 20% of all gastroenteritis, infecting
73 685 million people every year, making them the leading cause of gastroenteritis
74 worldwide (Ahmed et al., 2014). This virus has high diversity and all known noroviruses
75 are classified in seven genogroups (GI to GVII), but only NoV GI, GII and GIV are
76 capable to infect humans (Vinjé, 2015; White, 2014). NoV can cause both sporadic cases
77 and outbreaks during all the year, with a significant seasonality, having a peak of
78 incidence in cold seasons (Mounts et al., 2000). Most NoV gastroenteritis cases are due
79 to genogroup GII, precisely due to genotype GII.4, but recently the genotype GII.17
80 emerged, and its reports are increasing. For example, GII.17 has replaced GII.4 in China
81 (de Graaf et al., 2015; Pan et al., 2016).

82 The most common acute viral hepatitis is caused by HAV, a member of the
83 *Picornaviridae* family with an extremely high resistance to adverse conditions (Stuart et
84 al., 2018). Although it can be waterborne, HAV is mostly foodborne since the largest
85 recent outbreaks are associated with shellfish and frozen berries (Sánchez et al., 2002;
86 Scavia et al., 2017). Hepatitis A can be prevented by vaccination, but its vaccine is not
87 administered worldwide, having a global distribution divided in non-endemic countries
88 and endemic countries. Non-endemic regions are usually high-income countries where
89 the vaccination is administered, whereas endemic regions trends to be low-income

90 countries with poor water sanitation. There are also regions considered of intermediate
91 endemicity like Eastern Europe and Middle East (Jacobsen and Wiersma, 2010).

92 In recent years, hepatitis E virus (HEV), a viral agent with zoonotic potential,
93 has emerged HEV causes cases of foodborne hepatitis, sometimes with chronicity in
94 immunocomprised individuals (Ahmed et al., 2015), and complications in pregnant
95 women that may even lead to a higher mortality rate (Navaneethan et al., 2008). The fetus
96 is also affected by HEV through vertical transmission, abortions, and increasing morbidity
97 and mortality in neonates (Kamar et al., 2014). HEV has different genotypes and, unlike
98 HAV, there are some animal reservoirs. The most important non-human reservoir of HEV
99 genotypes that can infect humans are domestic pigs (*Sus scrofa*), but genotype 7 (HEV-
100 7) is capable to infect humans as well and was firstly isolated in camels (Lee et al., 2016;
101 Smith et al., 2014). A new genotype related with camels was recently described (HEV-
102 8), but it has not yet been demonstrated that it can infect humans too (Sander et al., 2018).

103 Saudi Arabia is an intermediate region with endemic HAV, but also has risk of
104 high HEV incomes because the close contact with camels. Furthermore, the high
105 temperatures and the long dry season of Saudi Arabia make water sources limited.
106 Despite of that, in wet season rainy events may produce waterborne incidents such floods
107 and outbreaks. Wadi Hanifa, located in an urban-industrial desert in Ryad, receives
108 treated wastewater from the Manfuha sewage treatment plant and its water is used for
109 irrigation. Although waterborne pathogens have been detected and described in stool
110 samples of children with gastroenteritis in Saudi Arabia (Arif et al., 1994; Kheyami,
111 2010; Tayeb et al., 2010, 2008), there is no information about the prevalence of any of
112 them in the water environment. In this study, we search for HAV, HEV and NoV GI and
113 GII in water samples of Wadi Hanifa and neighboring wells.

114 **2 - Material and methods**

115 **2.1 - Sample collection**

116 Thirteen 10-L water samples were collected monthly from December 2014 to
117 November 2015. Sampling locations are summarized in Fig. 1. Seven locations were

118 selected strategically to cover most of the Wadi Hanifa surface area, whereas the
119 remaining 6 locations cover wells between Wadi Hanifa and Batha channel. The total
120 number of samples was 156 (84 from Wadi Hanifa and 72 from well water).
121 Physicochemical and microbiological analysis were performed in all samples prior the
122 concentration.

123 **2.2 - Glass wool filtration**

124 All water samples were concentrated using an optimized glass wool filtration
125 method (Blanco et al., 2019) in King Saud University. Briefly, each water sample passed
126 through a positive-charged glass wool filter to detain all viruses in the sample. Then,
127 viruses were eluted with 200 mL of glycine beef extract (GBE) buffer (glycine 0.05M,
128 beef extract 3%) at pH 11, recirculating the buffer through the filter for 1 hour. After this
129 elution, 20% of polyethylene glycol (PEG) 6000 was added to the eluted and a secondary
130 concentration based on flocculation-precipitation was performed. The final volume of the
131 concentrated was 2.5 mL, and 1 mL of each concentrate was sent to University of
132 Barcelona. The concentrated was stored at -20°C until the nucleic acid extraction.

133 **2.3 - Total nucleic acid extraction**

134 Total RNA was extracted from 500 µl of the sample using NucliSENS®
135 miniMAG® extraction system (Biomérieux). Nucleic acid extraction was performed
136 according the instructions provided by the manufacturer, obtaining a final volume of
137 100µl. In order to track our nucleic acid extraction efficiency, 10 µl of Mengovirus were
138 added to each sample before the lysis step. Once extracted, all samples were stored at -
139 80°C.

140 **2.4 - Virus detection and quantification**

141 Mengovirus quantification and HAV, NoV GI and NoV GII screening were
142 performed by using a multiplex RT-qPCR previously developed in our laboratory
143 (Fuentes et al., 2014). Mengovirus recovery efficiencies $\geq 1\%$ are acceptable, whereas
144 recoveries $< 1\%$ are considered unacceptable and the nucleic acid extraction must be
145 repeated. Once all samples were confirmed to acceptable efficiencies, they were tested

146 for the presence of HAV, NoV GI and NoV GII, positive samples were then processed
147 in a monoplex RT-qPCR for quantifying these viruses. The monoplex RT-qPCR is
148 selected for quantification because the multiplex is slightly less sensible. Positive
149 samples not detected in the monoplex are qualified as “detectable non-quantifiable”
150 sample and in quantification was considered to have <5 copies/rxn.

151 Both multiplex and monoplex RT-qPCR have the same cycle: 60 minutes at 55°C
152 for reverse transcription and 5 minutes at 95°C for initial denaturalization, followed by
153 45 cycles for amplification containing three steps; 15 seconds at 95°C, 60 seconds at 60°C
154 and 60 seconds at 65°C. Fluorescence is read at every cycle after this last step.

155 HEV is detected and quantified in a separated RT-qPCR using primers and probe
156 previously described (Jothikumar et al., 2006). The amplification program is different
157 from the reference as we adapted the method: 30 minutes at 50°C for reverse transcription
158 and 10 minutes at 95°C for initial denaturalization. Then, 45 cycles for amplification with
159 two steps; 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 58° C. Fluorescence is read at every
160 cycle.

161 All qPCR were performed using Invitrogen® Ultrasense One Step RT-qPCR
162 System kit and Stratagene® Mx3000p thermocycler. All sets of primers and probes are
163 summarized in Table 1.

164 **2.5 - Statistical analysis**

165 Comparisons between positivity were performed using χ^2 test. Since
166 quantification data was not normally distributed, comparisons between means were
167 performed using the Mann Whitney test. P values < 0.05 were considered statistically
168 significant.

169 **3 - Results**

170 All 156 samples were screened for HAV, NoV GI, NoV GII and HEV. Of 84
171 Wadi Hanifa surface water samples, 34 (40.48%) were positive for HAV, 39 (46.43%)
172 for NoV GI and 56 (66.67%) for NoV GII. Considering all 72 well water samples, 31

173 (43.06%) were positive for HAV, 9 (12.5%) for NoV GI and 6 (8.33%) for NoV GII.
174 These results show no significant difference between surface water and well water for
175 HAV but are significantly different ($p < 0.05$) for both NoV GI and GII (Fig. 2). Two
176 samples were positive for HEV, both of them well water samples; one of them was
177 collected in May 2015 in the 4th well water sample location, and the other in November
178 2015, in the 1st well water sample location.

179 When quantifying positive samples, the mean log of genome copies/L (log gc/L)
180 oscillated between 1.04 to 2.83 for HAV, 1.69 to 3.76 for NoV GI and 1.96 to 3.63 for
181 NoV GII in surface water samples. The highest means values were observed in
182 September, June and March for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively. The lowest
183 mean values were in March, September and July, respectively. According these data, we
184 can consider that NoV was more present in water during winter, spring and summer,
185 whereas HAV levels increased in autumn (Table 2).

186 Well water samples quantifications showed ranges between 1.66-2.72, 1.69-1.94
187 and 1.68-1.75, for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively. The highest viral load
188 numbers for HAV, NoV GI and NoV GII occurred in August, February and January,
189 respectively, and the lowest in July, December & April, and August, respectively.
190 Nevertheless, the mean HAV quantification in summer (June-August) is higher than in
191 winter (December-February), so we can consider well water and surface water has similar
192 behaviors (Table 2).

193 A global comparison between surface water samples and well water samples
194 viral loads showed no significant differences regarding HAV detection, however, both
195 NoV GI and GII showed significant differences, with higher titers in surface water than
196 in well water. Considering separately the samples in each season (May-Sept for dry
197 season and Oct-March for wet season), no significant differences were observed between
198 surface and well water samples for HAV in any season, whereas for NoV GI and NoV
199 GII significant differences were only found in dry season.

200 Finally, the positive samples for HEV had a viral load of 2.96 log gc/ and 2.71
201 log gc/L for May and November well water samples, respectively.

202 4 - Discussion

203 Wadi Hanifa runs through the city of Riyadh and around 70% of the city is
204 located within its catchment area. The term “wadi” usually refers to a dry riverbed that
205 contains water only after heavy rain episodes, and this is the natural condition of Wadi
206 Hanifa. However, the sampling area covered in the present study, in the south of Wadi
207 Hanifa, bears a continuous flow of water resulting from the effluents of the Manfouha
208 sewage treatment plant, drained Riyadh groundwater and storm water channels draining
209 different sectors of the city (Alhamid et al., 2007). It also represents a convenient system
210 for disposing Riyadh wastewater.

211 Temperatures in summer reach an average of 42.9 °C (109.2 °F), and
212 precipitation averages only 60 millimeters (2.4 in) per year in the driest places. Rain falls
213 with great intensity for short periods between October and April, causing flash floods.
214 Usually April is the rainiest month, but 2015 had atypical heavy rains with floods in
215 October and November, affecting the results. The nature of the dry, warm climate leads
216 to a high percentage of the scarce rainfall being instantly evaporated. That which remains
217 mostly ends up as groundwater. While abundant, the levels of the water table are being
218 tested by the rapid growth the city of Riyadh has seen in the past fifty years, from a
219 population of 150,000 in 1960 to an estimated 5 million today. For that, Wadi Hanifa
220 surface and well water have a particular interest because their potential to contain high
221 titles of enteric viruses.

222 Prevalence of HAV, NoV GI and NoV GII are summarized in Fig. 2. Differences
223 in positivity between surface and well water samples are probably due to water filtration.
224 The similar HAV positivity for both types of samples and NoV lower prevalence in well
225 water samples would mean that HAV is more resistant to water filtration than NoV. The
226 higher HAV prevalence in both well water and surface water were detected in the driest
227 months (June-August). That could point groundwater protects viruses from temperature,
228 sunlight, and drought. For NoV, most of the positive samples were detected in December-
229 April and then prevalence decreases for NoV GI, with minimum prevalence in the first
230 two months of the wet season. HAV shows a similar behavior than NoV GI but its higher

231 prevalence is detected in June-September. For well water samples, all three viruses were
232 absent in rainy months. Heavy rain and floods could dilute viruses in water, causing that
233 NoV GI and HAV in surface water and all three viruses in well water were harder to
234 detect. Prevalence of NoV GII seems not to be affected by rain since its positivity was
235 about the same before and after the rainy period. There were also a negative correlation
236 between rainfall and HAV and NoV GI prevalence. For these two viruses, all three
237 months with floods registered (March, October, and November) showed significant
238 decreases in prevalence in surface and well water (Fig. 3 and 4). No correlation between
239 NoV GII and rainfall was observed. Nevertheless, in March 2015, NoV GII was not
240 detected in well water samples (Fig. 5).

241 Surface water presents a certain HAV-NoV duality when comparing viral loads.
242 HAV has its highest titer in August and September 2015 for well water and surface water,
243 respectively. In these months, NoV GI had its minimum viral load in surface water
244 samples and NoV GII quantification was one of the lowest in surface water and its
245 minimum in well water too. Additionally, lower HAV viral loads correlated with the
246 highest viral load period for NoV (January-March 2015). Similar results were found in
247 well water samples but only for NoV GI and HAV since NoV GII was mostly
248 undetectable.

249 HEV was detected in two well water samples, hence it seems that there is no
250 significant shedding of this virus in the environment. However, serological studies in
251 camels showed prevalences that could be higher than 68% in camels from the Middle
252 East (Bassal et al., 2019). The absence of HEV positive samples could be due that the
253 employed RT-qPCR assay only detects the major HEV genotypes (HEV-1 to HEV-4)
254 and not camel HEV genotypes.

255 In any case, this study has the limitation of covering only one year, and further
256 research is needed to confirm our data.

257

258

259 **5 - Conclusions**

260 Since this is the first enteric virus survey in water in Saudi Arabia, there is not
261 much information to compare, and our data are limited. Nevertheless, we can confirm the
262 higher prevalence in surface water than in well water samples for HAV and NoV.
263 Quantifications showed that both NoV GI and GII presents higher viral loads in Wadi
264 Hanifa than in the surrounding wells, but this is not the case of HAV, with similar titles
265 in well and surface water.

266 Our data also points to strong rainfall events that correlate with HAV/NoV GI
267 prevalence in surface water, but only with HAV in well water. We could also observe an
268 opposite pattern of the prevalence of HAV and NoV GI, and between the viral loads of
269 HAV and both NoV GI and GII.

270 The sporadic detection of HEV could point to the low prevalence of the major
271 genotypes of this pathogen in Saudi Arabia's environment. However, the discovery of
272 the zoonotic potential of HEV-7 and the recent description of HEV-8, both having camels
273 as their natural reservoir, in which they show a high seropositivity, make HEV screening
274 a major priority.

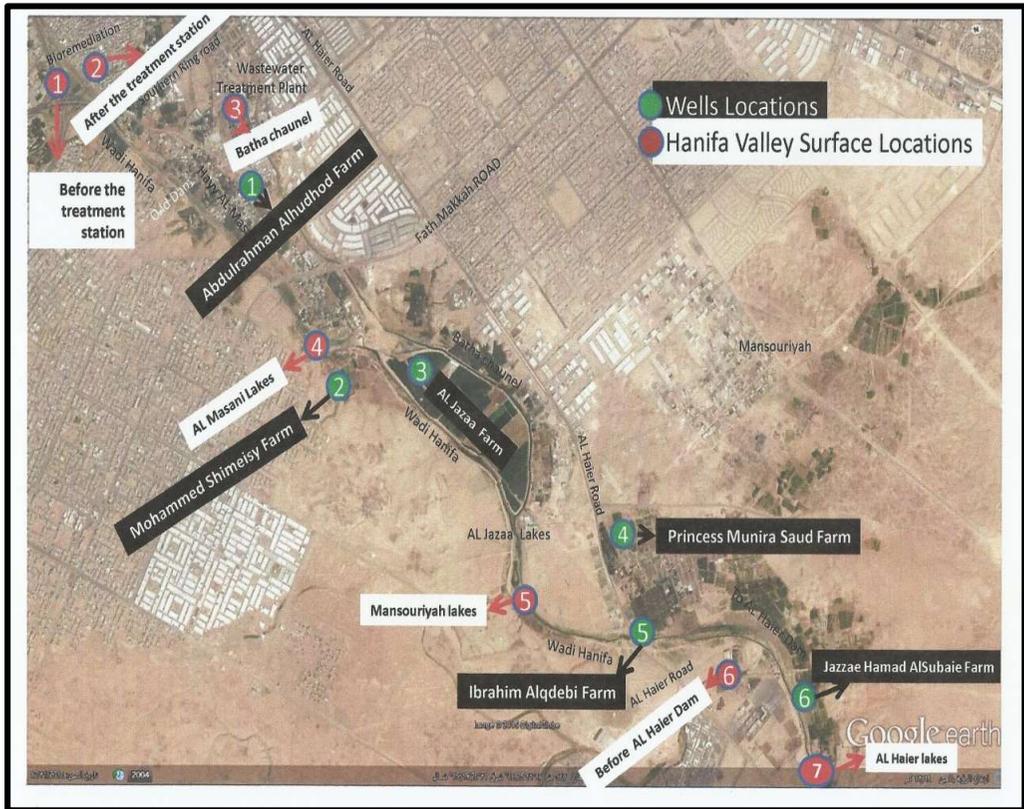
275 **References**

- 276 Ahmed, A., Ali, I.A., Ghazal, H., Fazili, J., Nusrat, S., 2015. Mystery of Hepatitis E
277 Virus: Recent Advances in Its Diagnosis and Management. *Int. J. Hepatol.* 2015,
278 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/872431>
- 279 Ahmed, S.M., Hall, A.J., Robinson, A.E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U.D.,
280 Koopmans, M., Lopman, B.A., 2014. Global prevalence of norovirus in cases of
281 gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14, 725–
282 730. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)
- 283 Alhamid AA, Alfayzi SA, Hamadto MA. A Sustainable Water Resources Management
284 Plan for Wadi Hanifa in Saudi Arabia. *Journal of King Saud University -*
285 *Engineering Sciences* 2007; 19: 209-221
- 286 Arif, M., Qattan, I., Al-Faleh, F., Ramia, S., 1994. Epidemiology of hepatitis E virus
287 (HEV) infection in Saudi Arabia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88, 163–8.
288 <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00034983.1994.11812854>

- 289 Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H.,
 290 Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., Graham, D.Y., 2014. Determination of the 50%
 291 Human Infectious Dose for Norwalk Virus. *J. Infect. Dis.* 209, 1016–1022.
 292 <https://doi.org/10.1093/infdis/jit620>
- 293 Bassal, R., Wax, M., Shirazi, R., Shohat, T., Cohen, D., David, D., Abu-Mouch, S.,
 294 Abu-Ghanem, Y., Mendelson, E., Ben-Ari, Z., Mor, O., 2019. Seroprevalence of
 295 hepatitis E virus in dromedary camels, Bedouins, Muslim Arabs and Jews in
 296 Israel, 2009–2017. *Epidemiol. Infect.* 147, e92.
 297 <https://doi.org/10.1017/S0950268819000062>
- 298 Blanco, A., Abid, I., Al-Otaibi, N., Pérez-Rodríguez, F.J., Fuentes, C., Guix, S., Pintó,
 299 R.M., Bosch, A., 2019. Glass Wool Concentration Optimization for the Detection
 300 of Enveloped and Non-enveloped Waterborne Viruses. *Food Environ. Virol.*
 301 <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09378-0>
- 302 Bosch, A., Pintó, R.M., Guix, S., 2016. Foodborne viruses. *Curr. Opin. Food Sci.* 8,
 303 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.04.002>
- 304 Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M., 2006. Development, evaluation, and
 305 standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for
 306 quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ.*
 307 *Microbiol.* 72, 3846–55. <https://doi.org/10.1128/AEM.02660-05>
- 308 da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le
 309 Guyader, F.S., 2007. Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater
 310 Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of
 311 Genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7891–7897.
 312 <https://doi.org/10.1128/AEM.01428-07>
- 313 de Graaf, M., van Beek, J., Vennema, H., Podkolzin, A.T., Hewitt, J., Bucardo, F.,
 314 Templeton, K., Mans, J., Nordgren, J., Reuter, G., Lynch, M., Rasmussen, L.D.,
 315 Iritani, N., Chan, M.C., Martella, V., Ambert-Balay, K., Vinjé, J., White, P.A.,
 316 Koopmans, M.P., 2015. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4
 317 era? *Euro Surveill.* 20. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178>
- 318 Fuentes, C., Guix, S., Pérez-Rodríguez, F.J., Fuster, N., Carol, M., Pintó, R.M., Bosch,
 319 A., 2014. Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus,
 320 norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water. *Food*
 321 *Microbiol.* 40, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.003>
- 322 Ganesh, A., Lin, J., 2013. Waterborne human pathogenic viruses of public health
 323 concern. *Int. J. Environ. Health Res.* 23, 544–564.
 324 <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.769205>
- 325 Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and
 326 world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28, 6653–6657.
 327 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.037>

- 328 Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A
329 broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive
330 detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131, 65–71.
331 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>
- 332 Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B.,
333 Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for
334 Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J.*
335 *Clin. Microbiol.* 41, 1548–57. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003>
- 336 Kamar, N., Dalton, H.R., Abravanel, F., Izopet, J., 2014. Hepatitis E Virus Infection.
337 *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 116–138. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
- 338 Kheyami, A.M., 2010. Rotavirus gastroenteritis and strain diversity in Saudi Arabia.
339 Current status and future prospects. *Saudi Med. J.* 31, 276–9.
- 340 Lee, G.-H., Tan, B.-H., Teo, E.C.-Y., Lim, S.-G., Dan, Y.-Y., Wee, A., Aw, P.P.K.,
341 Zhu, Y., Hibberd, M.L., Tan, C.-K., Purdy, M.A., Teo, C.-G., 2016. Chronic
342 Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who
343 Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* 150, 355–7.
344 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048>
- 345 Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S.,
346 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods*
347 123, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.023>
- 348 Mounts, A.W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J.S., Noel, J., Glass, R.I., 2000. Cold
349 Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses. *J.*
350 *Infect. Dis.* 181, S284–S287. <https://doi.org/10.1086/315586>
- 351 Navaneethan, U., Al Mohajer, M., Shata, M.T., 2008. Hepatitis E and pregnancy:
352 understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 28, 1190–1199.
353 <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x>
- 354 Pan, L., Xue, C., Fu, H., Liu, D., Zhu, L., Cui, C., Zhu, W., Fu, Y., Qiao, S., 2016. The
355 novel norovirus genotype GII.17 is the predominant strain in diarrheal patients in
356 Shanghai, China. *Gut Pathog.* 8, 49. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0131-3>
- 357 Sánchez, G., Pintó, R.M., Vanaclocha, H., Bosch, A., 2002. Molecular characterization
358 of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J.*
359 *Clin. Microbiol.* 40, 4148–55. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4148-4155.2002>
- 360 Sander, A.-L., Corman, V.M., Lukashev, A.N., Drexler, J.F., 2018. Evolutionary
361 Origins of Enteric Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8.
362 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031690>
- 363 Scavia, G., Alfonsi, V., Taffon, S., Escher, M., Bruni, R., Medici, D. De, Pasquale, S.
364 Di, Guizzard, S., Cappelletti, B., Iannazzo, S., Losio, N.M., Pavoni, E.,

- 365 Decastelli, L., Ciccaglione, A.R., Equestre, M., Tosti, M.E., Rizzo, C., National
366 Italian Task Force On Hepatitis A, 2017. A large prolonged outbreak of hepatitis
367 A associated with consumption of frozen berries, Italy, 2013–14. *J. Med.*
368 *Microbiol.* 66, 342–349. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000433>
- 369 Smith, D.B., Simmonds, P., International Committee on Taxonomy of Viruses
370 Hepeviridae Study Group, members of the I.C. on the T. of V.H.S., Jameel, S.,
371 Emerson, S.U., Harrison, T.J., Meng, X.-J., Okamoto, H., Van der Poel, W.H.M.,
372 Purdy, M.A., 2014. Consensus proposals for classification of the family
373 Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 95, 2223–32. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068429-0>
- 374 Stuart, D.I., Ren, J., Wang, X., Rao, Z., Fry, E.E., 2018. Hepatitis A Virus Capsid
375 Structure. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8.
376 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031807>
- 377 Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteijn, B.,
378 Koopmans, M., 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute
379 gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.* 45,
380 1389–94. <https://doi.org/10.1128/JCM.02305-06>
- 381 Tayeb, H.T., Al-Ahdal, M.N., Cartear, M.J., Al-Qahtani, A.A., Cruz, D.M. Dela, 2010.
382 Molecular epidemiology of human astrovirus infections in Saudi Arabia pediatric
383 patients. *J. Med. Virol.* 82, 2038–2042. <https://doi.org/10.1002/jmv.21897>
- 384 Tayeb, H.T., Dela Cruz, D.M., Al-Qahtani, A., Al-Ahdal, M.N., Carter, M.J., 2008.
385 Enteric viruses in pediatric diarrhea in Saudi Arabia. *J. Med. Virol.* 80, 1919–
386 1929. <https://doi.org/10.1002/jmv.21291>
- 387 Vinjé, J., 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus.
388 *J. Clin. Microbiol.* 53, 373–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14>
- 389 White, P.A., 2014. Evolution of norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 741–745.
390 <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12746>
- 391



393

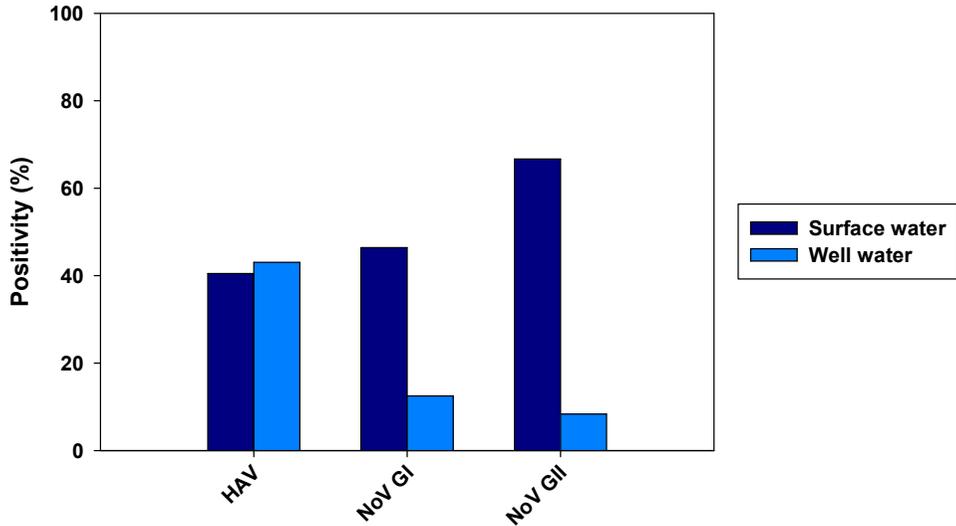
394 **Fig.1:** Sampling map. Wadi Hanifah sampling locations showing the main storm
395 channels. Insert: sampling locations (red: surface water; green: well water)

396

397 **Table 1:** Primers and probes employed for virus detection and quantification.

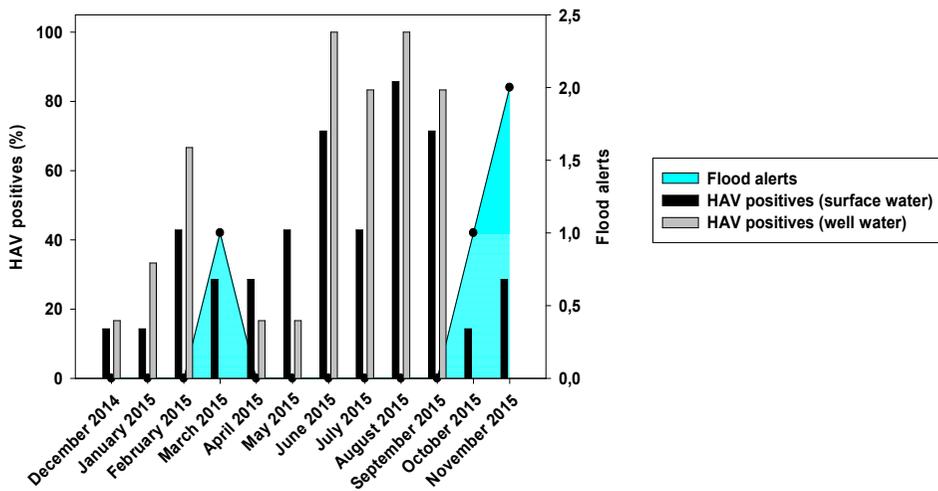
Virus	Primers	References
MgV	Fw: 5'-GCGGGTCCTGCCGAAAGT-3'	(Costafreda et al., 2006; Fuentes et al., 2014)
	Rv: 5'-TGCACGCCATCTTCATTCACA-3'	
	Probe (Multiplex): 5'-[VIC]-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-[MGB]-3'	
	Probe (Monoplex): 5'-[6FAM]-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-[MGB]-3'	
HAV	Fw: 5'-TCACCGCCGTTTGCTAG-3'	(Costafreda et al., 2006)
	Rv: 5'-GAGCCCTGGAAGAAAG-3'	
	Probe (Multiplex): 5'-[6FAM]-CCTGAACCTGCAGGAATTAA-[MGB]-3'	
	Probe (Monoplex): 5'-[6FAM]-CCTGAACCTGCAGGAATTAA-[MGB]-3'	
NoV GI	Fw: 5'-CGCTGGATGCGNTTCCAT-3'	(da Silva et al., 2007; Fuentes et al., 2014; Svraka et al., 2007)
	Rv: 5'-CCTTAGACGCCATCATCATTTAC-3'	
	Probe (Multiplex): 5'-[TxRED]-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-[IBRQ]-3'	
	Probe (Monoplex): 5'-[6FAM]-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-[TAMRA]-3'	
NoV GII	Fw: 5'-ATGTTAGRTGGATGAGRTTCTCWGA-3'	(Fuentes et al., 2014; Kageyama et al., 2003; Loisy et al., 2005)
	Rv: 5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'	
	Probe (Multiplex): 5'-[ATTO]-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-[BHQ]-3'	
	Probe (Monoplex): 5'-[6FAM]-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-[TAMRA]-3'	
HEV	Fw: 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'	(Jothikumar et al., 2006)
	Rv: 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'	
	Probe: 5'-[6FAM]-TGATTCTCAGCCCTTCGC-[BHQ]-3'	

398



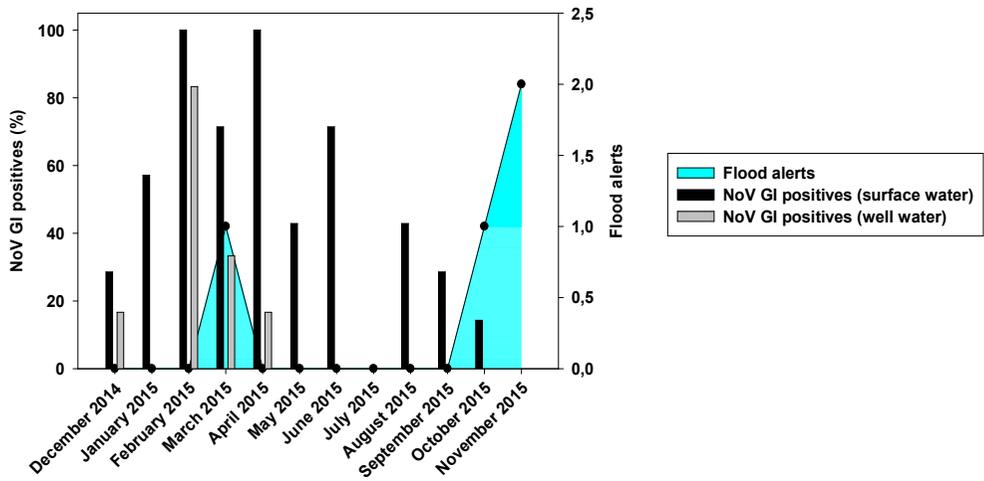
399

400 **Fig.2:** Positivity of surface water samples and well water samples. Prevalence of both
 401 NoV GI and GII is significantly higher in Wadi Hanifa surface water samples.



402

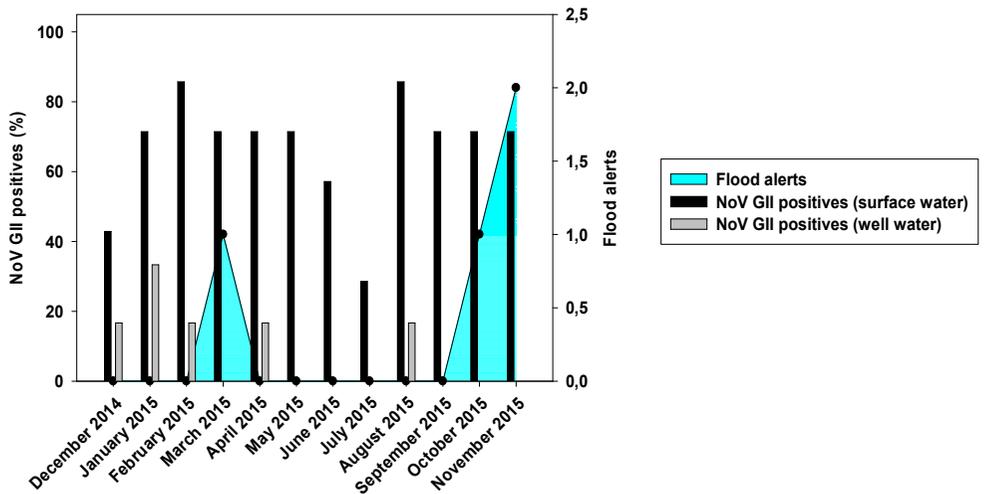
403 **Fig. 3:** Monthly HAV positivity for both surface and well water compared with floods.



404

405

Fig. 4: Monthly NoV GI positivity for both surface and well water compared with flood.



406

407

408

Fig. 5: Monthly NoV GII positivity for both surface and well water compared with flood.

409

410 **Table 2:** HAV, NoV GI and NoV GII mean viral load per month for surface and well
 411 water samples. NA means that any of the samples were positive for that virus.

Month	Viral load (Log ₁₀ Mean ± SD)					
	Surface water			Well water		
	HAV	NoV GI	NoV GII	HAV	NoV GI	NoV GII
December 2014	1.63 ± 0.00	3.40 ± 0.21	3.10 ± 0.99	1.69 ± 0.00	1.69 ± 0.00	1.69 ± 0.00
January 2015	1.69 ± 0.00	3.36 ± 0.09	3.29 ± 0.83	1.69 ± 0.00	NA	1.75 ± 0.05
February 2015	1.20 ± 0.50	3.06 ± 0.17	2.60 ± 0.75	1.69 ± 0.00	1.94 ± 0.39	1.69 ± 0.00
March 2015	1.04 ± 0.65	3.45 ± 0.52	3.63 ± 0.36	NA	1.78 ± 0.08	NA
April 2015	1.58 ± 0.11	2.46 ± 0.78	3.27 ± 0.87	1.69 ± 0.00	1.69 ± 0.00	1.69 ± 0.00
May 2015	1.86 ± 0.23	2.63 ± 0.70	2.50 ± 1.01	1.69 ± 0.00	NA	NA
June 2015	2.33 ± 0.52	3.76 ± 1.04	3.41 ± 0.16	2.15 ± 0.34	NA	NA
July 2015	1.91 ± 0.15	NA	1.96 ± 0.27	1.66 ± 0.34	NA	NA
August 2015	2.57 ± 0.83	3.36 ± 0.17	3.02 ± 0.97	2.72 ± 0.47	NA	1.68 ± 0.00
September 2015	2.83 ± 0.98	1.69 ± 0.00	2.02 ± 0.30	1.90 ± 0.17	NA	NA
October 2015	1.69 ± 0.00	2.94 ± 0.00	2.37 ± 0.58	NA	NA	NA
November 2015	2.78 ± 0.29	NA	3.08 ± 0.93	NA	NA	NA

412

4.4 - Capítulo IV: From Classic Human Enteric Viruses to Emerging Viruses: the Llobregat Delta Study

Autores: **Albert Blanco**, Susana Guix, Rosa Maria Pintó, Albert Bosch.

El río Llobregat ha sido siempre un punto de gran interés a la hora de determinar la presencia de virus entéricos en la población gracias a las más de 30 de plantas depuradoras que vierten aguas regeneradas en su cuenca. Años atrás el grupo analizó la presencia de NoV en puntos estratégicos del recorrido del río que abarcaba buena parte del recorrido. Solo quedaron por analizar las zonas relativas al nacimiento y a la desembocadura del mismo.

De los dos puntos restantes la desembocadura es un punto de difícil acceso. El delta del Llobregat se ha consolidado como una reserva natural donde cientos de aves migratorias que pueden ser vectores de patógenos que, si bien no hacen uso de la ruta fecal-oral en su ciclo, sí pueden llegar al agua y, por ende, ser detectados en la misma, como el virus de la influenza o WNV. Del mismo modo, el delta recibe agua regenerada de la depuradora del Prat del Llobregat. Este punto de muestreo tan interesante requiere de un permiso especial para poder hacer los análisis pertinentes, con lo que se hizo un convenio con el Consorci per a la Protecció i la Gestió dels Espais Naturals del Delta del Llobregat para poder obtener muestra de uno de los estanques del delta.

Las aguas recolectadas durante los años 2017 y 2018 fueron concentradas con el método optimizado de filtración por lana de vidrio para luego determinar la presencia tanto de virus entéricos clásicos - HAV, NoV - como virus emergentes tanto de cápside desnuda - los nuevos AstV MLB y VA - como envueltos - CoV, WNV, virus de la influenza A. La misma lista de virus fue analizada en aguas de entrada de la depuradora del Prat del Llobregat obtenidas

en un periodo de tiempo similar. Para poder determinar la presencia de WNV e influenza se adaptaron métodos desarrollados en otros grupos.

Se observaron diferencias significativas tanto en prevalencia como en carga entre las muestras del estanque de Cal Tet y las de la depuradora, siendo siempre mayor en estas últimas. Se pudieron detectar todos los virus a excepción de influenza y WNV-1. Una de las muestras de aguas residuales resultó positiva para CoV, y al secuenciarlo se detectó una nueva secuencia de *Alphacoronavirus* de roedor, distinta a la hallada en el artículo II. Del mismo modo, una de las muestras del delta fue positiva para WNV-2. Este hecho es de gran relevancia no solo por la importancia del patógeno detectado, sino porque ocurrió pocos meses después de que se detectara en Cataluña la primera ave de presa infectada por el mismo linaje de WNV.

Los resultados resaltan la importancia y la utilidad de llevar a cabo una vigilancia de virus en aguas, tanto residuales como crudas, como método de control de la circulación de virus en una región antes de manifestarse en la población, y como estrategia de detección y caracterización de virus hasta ahora desconocidos.

23 **Abstract**

24 The Llobregat Delta is a natural reserve nearby an airport, a Wastewater Treatment Plant
25 and surrounded by orchards that use the resulting treated water for irrigation.
26 Approximately 400 species of migratory birds with zoonotic potential use this area for
27 resting, feeding and breeding, making the Llobregat Delta an interesting area for
28 detecting and tracking both classical enteric viruses – such hepatitis A virus, norovirus
29 and astrovirus – and non-enteric viruses that could be detected in water – West-Nile virus,
30 coronavirus and influenza virus. Collecting water once a month for two years (2017-
31 2018) in Cal Tet pond and concentrating viruses with an optimized glass-wool filtration
32 method allow us to detect and quantify classical enteric viruses and emerging viruses by
33 RT-qPCR – with the exception of coronavirus that were detected by seminested RT-PCR.
34 We could also compare these results with those obtained in Prat del Llobregat WWTP
35 wastewater surveillance in the same period. Results show higher prevalence and viral
36 load in wastewater for most of the viruses, with the exception of astrovirus VA4 and
37 West-Nile virus lineage 2, only detected in Cal Tet pond. In march 2018 a novel
38 alphacoronavirus were detected in wastewater, which sequence is similar to novel rodent
39 alphacoronaviruses recently found around the world.

40

41 **Introduction**

42 Despite the advances in wastewater treatment, waterborne transmission is still
43 one of the most important routes for both bacteria and viruses (Gall et al., 2015; Ramírez-
44 Castillo et al., 2015). Fecal-oral route is used by a large amount of pathogens to reach the
45 environment, with the consequent contamination of water and therefore food. Detection
46 and characterization of viruses in water is an ideal method for knowing the pathogens
47 circulating in a region. Thus, our group has already performed similar studies, i.e.
48 norovirus prevalence in Llobregat river (Pérez-Sautu et al., 2012), covering most of the
49 river's length. In the past study two spots were not covered; Llobregat springs and
50 Llobregat Delta.

51 The Delta is an interesting area because is surrounded by orchards that uses treated water
52 coming from a neighboring Wastewater Treatment Plant (WWTP) for irrigation. The
53 same treated water is poured by the WWTP into the river and some ponds located at this
54 Delta. An optimal water treatment is needed to avoid waterborne virus transmission, and
55 water belonging from this part of the river could be useful for tracking the potential
56 enteric virus transmission through vegetables coming from these orchards.

57 The major foodborne and waterborne viruses, such hepatitis A virus, norovirus and
58 astrovirus are not the only viruses that can be detected in water. Some other pathogens
59 can reach water despite not being the main transmission route. Llobregat Delta is used
60 by more than 400 migratory bird species coming from Africa and north Europe for
61 feeding, resting, moulting and breeding. Since birds act as natural reservoirs of some
62 viruses with zoonotic potential like influenza virus and West-Nile virus, migratory birds
63 have an important role in their cross-country spread. These viruses have also the potential
64 to reach the water environment; influenza virus infects only the lower respiratory tract in
65 humans, but in birds causes a generalized infection, making influenza virus able shed in
66 feces and reach the environment (Worobey, 2008). For WNV, the main transmission is
67 through mosquitoes belonging to the *Culex* genus but can reach water through feathers
68 and carcasses (Nemeth et al., 2009). Furthermore, WNV has been detected in

69 gastrointestinal tracts of infected individuals and some studies suggest foodborne and
70 waterborne transmissions between birds are possible (Komar et al., 2002).

71 Having on mind the nearby WWTP and the large amount of migratory birds, it could be
72 really useful to know the prevalence of the mentioned pathogens in the Llobregat Delta
73 water to track not only the usual waterborne viruses, but also the non-waterborne viruses
74 that may reach water environment. However, the Delta condition of natural reserve since
75 1987 poses difficulties to sampling. Thus, there are currently no data on the presence of
76 human pathogens in the area. Thanks to the Consorci per a la Protecció i la Gestió dels
77 Espais Naturals del Delta del Llobregat, we could sample the Cal Tet pond for the
78 detection and quantification of both foodborne and non-foodborne pathogens; hepatitis
79 A, norovirus GI and GII, novel astrovirus, coronavirus, influenza and West-Nile virus.
80 The study is complemented with another screening in raw wastewater samples collected
81 at the WWTP that comprises most of the Delta sampling period.

82 **Material and methods**

83 **Cal Tet water sample collection**

84 We were allowed to collect 20 liter-samples of water from Cal Tet pond, located in the
85 natural reserve, once a month during a two-year period (January 2017-December 2018).
86 Since samples were processed and analyzed once collected, the results generated led us
87 to collect two extra samples in November and December of 2018. Then, the total number
88 of samples collected was 26. A basic physicochemical analysis was done before
89 collection, determining temperature, pH and conductivity. additionally, an aliquot was
90 employed to determine total aerobic bacteria, fecal coliforms and fecal enterococci.

91 Cal Tet pond was the selected sampling location by the consortia, since it receives
92 estuarine water and sand-filtered river water. Last but not least, it is one of the
93 locations bearing the highest bird population and in drought periods also receives treated
94 water from the WWTP.

95 **Wastewater sample collection**

96 Due the enterovirus outbreak of 2016 when near 100 children were affected by
97 enterovirus A71 (Casas-Alba et al., 2017; González-Sanz et al., 2019), the Public Health
98 Department from the Autonomous Government of Catalonia launched a wastewater
99 surveillance study, to complement that performed on clinical samples for the detection
100 and characterization of enterovirus. The same wastewater samples were used to detect and
101 quantify other viruses. Aiguës de Barcelona collected three wastewater samples in May
102 2017, and one sample every month since June 2017 to December 2018 that were analyzed
103 in our facilities. The sampling location for raw sewage was the Prat del Llobregat WWTP.
104 This WWTP receives wastewater from Barcelona and surrounding areas.

105 **Sample concentration**

106 Cal Tet samples were concentrated using an optimized glass wool filtration method
107 developed in our laboratory (Blanco et al., 2019). The entire 20-liter sample was passed
108 through a positively charged glass wool filter, retaining the viruses present in the sample.
109 After the filtration, viruses were eluted using glycine-beef extract (GBE) buffer, pH 11.
110 The buffer detached the viruses by recirculation through the filter for 1 hour, followed
111 by a secondary concentration based on polyethylene glycol (PEG) 6000 flocculation/
112 precipitation. The resulting volume was 7 ml of concentrated, that were stored at -80°C.

113 For sample reconcentration, an optimized PEG 6000 flocculation/precipitation was
114 performed. Fifty ml of GBE buffer, pH 9.5 was added to 400 ml of wastewater. After
115 addition of 20% of PEG 6000 and NaCl the mix was allowed to flocculate for 24 hours,
116 and viruses were thereafter precipitated by centrifugation at 7500xg during 90 minutes.
117 The pellet was resuspended in 2 ml of PBS. The final volume was stored at -80°C.

118 **Nucleic acid extraction**

119 Total RNA was extracted from 1 ml of the sample using the NucliSENS® miniMAG®
120 extraction system (Biomérieux), following the manufacturer's instructions, obtaining 50
121 µl as the eluted final volume. All samples were stored at -80°C before the analysis.

122 **West-Nile virus RT-qPCR adaptation**

123 WNV is one of the most interesting non-waterborne pathogens that can however
124 contaminate water. , The Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) shared
125 with our laboratory their RT-qPCR protocol for detection and quantification of lineages
126 1 and 2 of WNV separately (Jiménez de Oya et al., 2018), and plasmids containing the
127 target region as well.

128 Plasmids were resuspended in INVITROGEN UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled
129 Water. Then, plasmids were quantified using Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.
130 The resulting quantification was used to determine the dilution containing 1-10 ng/μl of
131 DNA to transform INVITROGEN Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells,
132 following the manufacturer's instructions. The resulting DH5α and the plasmid control
133 for WNV-1 and WNV-2 were grown separately in LB plates with 100 μg/ml ampicillin.
134 One colony of each plate was selected to grow in 100 ml of LB with 100 μg/ml ampicillin
135 for plasmid extraction the by using OriGene PowerPrep® HP Plasmid Midiprep System.
136 Two ml of each DH5α aliquots were then stored at -80°C for future plasmid extractions
137 if needed.

138 Ten-fold dilution series of both WNV-1 and WNV-2 standards were used to adapt INIA's
139 RT-qPCR to our facilities, using INVITROGEN RNA UltraSense One-Step Quantitative
140 RT-PCR System. The final primers and probe concentrations were the same as in INIA's
141 protocol. The cycles were modified as follows: 30 minutes at 50°C for reverse
142 transcription, then a denaturalization step of 10 minutes at 95°C, and finally 45
143 amplification cycles of 15 seconds at 95°C, then 60 seconds at 65°C. Fluorescence was
144 measured after the last step.

145 **Influenza virus RT-PCR adaptation**

146 Another non-waterborne pathogen of interest is influenza virus, and we employed Dr.
147 Inmaculada Casas (Instituto de Salud Carlos III) protocols to propagate an Influenza A
148 H1N1 California 2009 stock, also provided by Dr. Casa s that was used as positive
149 control for the qualitative RT-qPCR. Stocks of influenza A H1N1 were produced after
150 infection of MDCK-SIAT1 cell cultures. Briefly, we added 0.5 ml of the initial virus
151 stock to a confluent 80cm² MDCK-SIAT1 flask (M.O.I = 2.5) after washing the

152 monolayer twice. The virus was in contact with the cell lines 30 minutes before adding
153 post-infection medium: DMEM 0% with penicillin-streptomycin, HEPES 25 mM and
154 TPCK-treated trypsin (Sigma) 2.5 ug/ml. After 2-3 days we observed CPE and the
155 cultures supernatant was recovered. Then the new influenza virus stock titer was figured
156 infecting a 96-well plate of confluent MDCK-SIAT1 cells for determination of the
157 TCID₅₀/ml.

158 Once produced, a 10-fold dilution series of the new influenza A virus stock was used to
159 adapt the CRC RT-qPCR in our laboratory (WHO, 2015). The amplification cycle and
160 final primers and probe concentrations were not modified, but the mix was produced by
161 using INVITROGEN RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System.

162 **Virus detection and quantification**

163 Both Cal Tet and wastewater samples were analyzed for the following viruses: hepatitis
164 A virus, noroviruses GI and GII, coronavirus, novel astroviruses (MLB-1, MLB-2, MLB-
165 3, VA1, VA2, VA3 and VA4), influenza virus and West-Nile virus. With the exception
166 of coronaviruses, all the mentioned pathogens were detected and quantified with RT-
167 qPCR. HAV, NoV GI and NoV GII screening was performed following the ISO 15216
168 RT-qPCR. Novel astroviruses were analyzed by using three duplex RT-qPCR based on
169 the molecular methods for detect and quantify these six genotypes separately (Cordey et
170 al., 2017). The modifications that convert these six monoplex into three duplex are
171 described elsewhere (Vu et al., 2019). WNV and influenza A virus were detected using
172 the adapted methods earlier described.

173 For coronavirus detection we used a seminested RT-PCR for both alpha and
174 betacoronaviruses (Gouilh et al., 2011) with some modifications described in another
175 work (Blanco et al., 2019). All positive samples were sequenced by a Sanger-derived
176 method to identify the detected coronavirus.

177

178 **Statistical analysis**

179 Cal Tet water and wastewater positivities were compared by χ^2 test. Mann Withney test
180 was used instead of the t-student test since quantification data were not normally
181 distributed. P values < 0.05 were considered statistically significant in all tests.

182 **Results**

183 **Cal Tet physicochemical and bacteriological analysis**

184 Physicochemical analysis are summarized in Table 1. Every three months the mean and
185 standard deviation was calculated. In this way we could observe that the pH was
186 relatively stable through time and the conductivity had maximum values in the summer
187 months (July-September), and minimum in the cold months (January-March). This
188 tendency was clearer in 2017 than in 2018. Water temperature showed similar tendencies,
189 but the coldest period was from October to December in 2017, and not in January-March
190 as in 2018, probably due to the relatively warm temperatures in early 2017.

191 Bacteriological analysis are summarized in Fig. 1. Like conductivity and temperature,
192 aerobic and coliform counts were highest in summer and lowest in winter, being total
193 aerobic counts at least 0.5 logs higher than coliform counts. Enterococci were usually not
194 found in Cal Tet water, and their numbers were low when detectable; from 2 to 8 cfu/ml.

195 **Water samples analysis**

196 Comparison between prevalence in both types of water samples are summarized in Fig.
197 2. After the classic enteric virus screening, in Cal Tet water samples, 6 out of 24 (25%)
198 were positive for HAV, 1 (4.17%) for NoV GI and 1 for NoV GII. The novel astrovirus
199 analysis showed 4 positives (16.67%) for MLB-1, 2 (8.33%) for VA1, 1 for VA2, 1 for
200 VA3 and 1 for VA4. The positivity of VA1, VA3 and VA4 was detected in the same
201 sample. All samples were negative for MLB-2 and MLB-3. None of the samples were
202 positive for CoV, influenza A virus and WNV-1, but in December 2017 the water sample
203 was positive for WNV-2. Most of the positive samples belonged to the 2017 sampling;

204 in 2018 only had two positives for HAV, the positive sample for NoV GI and 2 positive
205 samples for MLB-1.

206 Wastewater samples showed significantly higher positivity than Cal Tet water samples.
207 11 out of 22 (50%) were positive for HAV, 21 (95.45%) for NoV GI and 21 for NoV GII.
208 Novel Astrovirus had also higher prevalence in wastewater samples; 14 (63.64%) was
209 positive for MLB-1, 7 (31.82%) for MLB-2 and MLB-3, and 12 (54.55%), 15 (68.18%)
210 and 10 (45.45%) positive samples for VA1, VA2 and VA3, respectively. All samples
211 were negative for VA4, WNV and influenza virus. For CoV, the March 2018 sample
212 came out to be positive in the seminested RT-PCR assay.

213 Quantification of all viruses is summarized in Fig. 3. Since most of viruses had only a
214 single positivity in Cal Tet samples, mean and standard deviation were only figured for
215 HAV, MLB-1 and VA1 quantifications a. Viruses showed a very different presence
216 pattern in the pond; noroviruses were not only two of the least detected viruses, but also
217 the viruses with the lowest titers; 0.32 logs of genome copies/L for GI and 0.2 for GII. In
218 contrast, WNV had the highest titer (5.51 logs gc/L), and HAV was the virus with highest
219 SD (1.75 ± 1.82 logs gc/L). All the novel detected astroviruses had similar means; 2.74
220 ± 0.91 for MLB-1, 2.74 ± 0.33 for VA1, 2.55 for VA2, 2.51 for VA3 and 2.49 for VA4.

221 Viruses detected in both types of water have higher titers in wastewater than in Cal Tet
222 water samples, with HAV as the virus with the lowest levels, with 2.76 ± 0.69 logs gc/L.
223 Noroviruses viral loads were 4.51 ± 0.95 and 4.15 ± 0.78 , for norovirus GI and GII,
224 respectively. MLB-2 and MLB-3 had titers of 2.86 ± 0.58 logs of gc/L whereas the rest
225 of the novel astroviruses presented viral loads higher than 3 logs gc/L; 3.47 ± 1.28 , 4.52
226 ± 0.94 and 3.83 ± 0.80 logs gc/L for VA1, VA2 and VA3, respectively.

227 with regard to the WNV-2 detected in December 2017, we only were able to sequence
228 the RT-qPCR fragment in the 3'NCR of the virus genome. This small sequence fragment
229 confirmed us that the virus belonged to the WNV lineage 2, related with other viruses
230 found in birds, most of them goshawks, in several countries of Central Europe; Austria,
231 Hungary Slovakia and Czech Republic (Fig. 4). Regarding the detected coronavirus,
232 sequencing the amplicon of the seminested RT-PCR allowed us to determine the RdRp

233 sequence that evidenced that it belonged to an alphacoronavirus closely related with other
234 rat coronaviruses found in Eurasia (Fig. 5).

235 **Discussion**

236 Cal Tet water and wastewater samples showed statistically significant differences in
237 prevalence of all viruses found in both types of samples; HAV, NoV GI, NoV GII, MLB-
238 1, VA1, VA2 and VA3. For viruses only found in one type of sample, only MLB-2 and
239 MLB-3 prevalence were significantly different. The absence in Cal Tet samples of MLB-
240 2 and MLB-3 and the presence of VA4 (not found in wastewater samples), could
241 strengthen the possible role of wild animals as novel astroviruses reservoirs.

242 Only NoV GI, NoV GII and AstV VA2 and VA3 showed viral loads significantly
243 different in wastewater and Cal Tet water samples, with higher titers in wastewater. The
244 rest of the viruses occurred in similar levels in both types of samples, and this is
245 particularly interesting for hepatitis A virus. The mean and the SD in Cal Tet samples for
246 HAV were high, since the January 2017 sample already reached by itself 5.57 logs gc/L.
247 This could probably be due to the large outbreak of hepatitis A that struck in Europe and
248 that affected the men-having-sex-with men collective from 2016 to 2018 (Sabrià et al.,
249 2019). HAV could reach Cal Tet water through treated wastewater coming from the
250 WWTP employed to prevent the pond from drying.

251 One of the most important data produced in Cal Tet samples was the WNV-2 sequence
252 detected in December 2017. Their relationship with a goshawk WNV-2 reported in other
253 European countries is extremely relevant since in September 2017, colleagues from the
254 CReSA (Research Center on Animal Health) detected the first predatory bird infected
255 by WNV, being a goshawk (Busquets et al., 2019). This species is well known in Central
256 and North Europe for the migration of part of their population, reaching the Spanish
257 Mediterranean coast and hence the Llobregat Delta following the Mediterranean-Black
258 Sea pathway. The sequence found in September is also similar to that of another WNV
259 of Central Europe (Bakonyi et al., 2016; Drzewnioková et al., 2019; Hubálek et al., 2018;
260 Kolodziejek et al., 2018), but we could not compare our sequence with that of the

261 goshawk found in Catalonia because we sequenced the 3'-NCR, whereas the sequence
262 obtained by CReSA corresponded to the NS5 gene.

263 The novel alphacoronavirus found in wastewater in March 2018 was closely related to
264 other rodent coronaviruses recently reported in other countries like Germany, China and
265 United Kingdom (Ge et al., 2017; Tsoleridis et al., 2019, 2016; Wang et al., 2015). Our
266 group already described a novel rodent alphacoronavirus detected in Saudi Arabia surface
267 water sample in September 2015, (Genbank ID: KY565343.1); nevertheless, but both
268 sequences were significantly different from each other.

269 **Conclusions**

270 Virus ecology was significantly different in Cal Tet pond and the wastewater coming
271 from the Barcelona Metropolitan area. As expected, the prevalence was significantly
272 higher in wastewater than in Cal Tet, but only few of the pathogens showed significant
273 differences in the viral load. Highest HAV loads were detected in early 2017, the same
274 period when the HAV outbreak that affected the MSM collective in Europe had the
275 maximum incidence peak. The HAV persistence and the low precipitations in December
276 2016 and part of January 2017 could favor that HAV reached Cal Tet water through
277 treated wastewater.

278 Novel coronaviruses related to rodents are being detected and identified in several
279 countries from Europe and Asia, but none was described in Spain until our wastewater
280 surveillance. When compared with the other sequence found in the mentioned study, we
281 could observe that the Barcelona wastewater sequence is more related to rat
282 coronaviruses than the one earlier reported in Saudi Arabia, which was closer to
283 coronaviruses found in other rodents. These findings demonstrate the relevance of
284 rodents as CoV reservoirs.

285 West-Nile virus finding in December 2017 was indeed significant since three months
286 earlier an infected goshawk was detected in Catalonia. Despite we cannot compare our
287 sequence with that reported by the CReSA, since different regions were sequenced in
288 each case, both sequences point to the same origin; predatory birds coming from Central

289 and Eastern Europe. These findings highlight the crucial role of birds as reservoirs of
290 WNV and their capacity to spread some zoonotic diseases.

291 **References**

- 292 Bakonyi, T., Gajdon, G.K., Schwing, R., Vogl, W., Hübich, A.-C., Thaller, D.,
293 Weissenböck, H., Rudolf, I., Hubálek, Z., Nowotny, N., 2016. Chronic West Nile
294 virus infection in kea (*Nestor notabilis*). *Vet. Microbiol.* 183, 135–139.
295 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.012>
- 296 Blanco, A., Abid, I., Al-Otaibi, N., Pérez-Rodríguez, F.J., Fuentes, C., Guix, S., Pintó,
297 R.M., Bosch, A., 2019. Glass Wool Concentration Optimization for the Detection
298 of Enveloped and Non-enveloped Waterborne Viruses. *Food Environ. Virol.*
299 <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09378-0>
- 300 Busquets, N., Laranjo-González, M., Soler, M., Nicolás, O., Rivas, R., Talavera, S.,
301 Villalba, R., San Miguel, E., Torner, N., Aranda, C., Napp, S., 2019. Detection of
302 West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg.*
303 *Dis.* 66, 617–621. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>
- 304 Casas-Alba, D., de Sevilla, M.F., Valero-Rello, A., Fortuny, C., García-García, J.-J.,
305 Ortez, C., Muchart, J., Armangué, T., Jordan, I., Luaces, C., Barrabeig, I.,
306 González-Sanz, R., Cabrerizo, M., Muñoz-Almagro, C., Launes, C., 2017.
307 Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia,
308 Spain (2016): a clinical observational study in a children’s reference centre in
309 Catalonia. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 874–881.
310 <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016>
- 311 Cordey, S., Vu, D.-L., Zanella, M.-C., Turin, L., Mamin, A., Kaiser, L., 2017. Novel and
312 classical human astroviruses in stool and cerebrospinal fluid: comprehensive
313 screening in a tertiary care hospital, Switzerland. *Emerg. Microbes Infect.* 6, e84.
314 <https://doi.org/10.1038/emi.2017.71>
- 315 Drzewnioková, P., Barzon, L., Franchin, E., Lavezzo, E., Bakonyi, T., Pisl, J., Csank,
316 T., 2019. The complete genome sequence analysis of West Nile virus strains
317 isolated in Slovakia (central Europe). *Arch. Virol.* 164, 273–277.
318 <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4056-7>
- 319 Gall, A.M., Mariñas, B.J., Lu, Y., Shisler, J.L., 2015. Waterborne Viruses: A Barrier to
320 Safe Drinking Water. *PLoS Pathog.* 11, e1004867.
321 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004867>
- 322 Ge, X.-Y., Yang, W.-H., Zhou, J.-H., Li, B., Zhang, W., Shi, Z.-L., Zhang, Y.-Z., 2017.
323 Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China. *Virol.*
324 *J.* 14, 98. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0766-9>

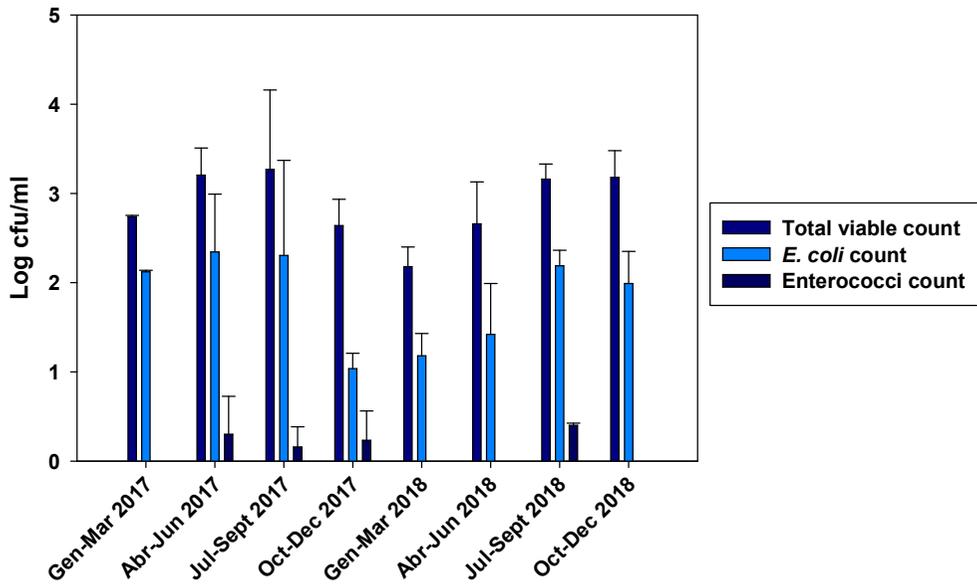
- 325 González-Sanz, R., Casas-Alba, D., Launes, C., Muñoz-Almagro, C., Ruiz-García,
326 M.M., Alonso, M., González-Abad, M.J., Megías, G., Rabella, N., Del Cuerpo,
327 M., Gozalo-Margüello, M., González-Praetorius, A., Martínez-Sapiña, A.,
328 Goyanes-Galán, M.J., Romero, M.P., Calvo, C., Antón, A., Imaz, M.,
329 Aranzamendi, M., Hernández-Rodríguez, Á., Moreno-Docón, A., Rey-Cao, S.,
330 Navascués, A., Otero, A., Cabrerizo, M., 2019. Molecular epidemiology of an
331 enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain,
332 2016. *Euro Surveill.* 24. [https://doi.org/10.2807/1560-](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089)
333 [7917.ES.2019.24.7.1800089](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089)
- 334 Gouilh, M.A., Puechmaille, S.J., Gonzalez, J.-P., Teeling, E., Kittayapong, P.,
335 Manuguerra, J.-C., 2011. SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East
336 Asian bat colonies and the refuge theory. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1690–1702.
337 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.021>
- 338 Hubálek, Z., Kosina, M., Rudolf, I., Mendel, J., Straková, P., Tomešek, M., 2018.
339 Mortality of Goshawks (*Accipiter gentilis*) Due to West Nile Virus Lineage 2.
340 *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 18, 624–627. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2289>
- 341 Jiménez de Oya, N., Camacho, M.-C., Blázquez, A.-B., Lima-Barbero, J.-F., Saiz, J.-C.,
342 Höfle, U., Escribano-Romero, E., 2018. High susceptibility of magpie (*Pica pica*)
343 to experimental infection with lineage 1 and 2 West Nile virus. *PLoS Negl. Trop.*
344 *Dis.* 12, e0006394. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006394>
- 345 Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Aberle, S.W., Allerberger, F., Bagó, Z., Camp, J. V,
346 Dimmel, K., de Heus, P., Kolodziejek, M., Schiefer, P., Seidel, B., Stiasny, K.,
347 Nowotny, N., 2018. Integrated analysis of human-animal-vector surveillance:
348 West Nile virus infections in Austria, 2015-2016. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 25.
349 <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0021-5>
- 350 Komar, N., Lanciotti, R., Bowen, R., Langevin, S., Bunning, M., 2002. Detection of West
351 Nile Virus in Oral and Cloacal Swabs Collected from Bird Carcasses. *Emerg.*
352 *Infect. Dis.* 8, 741–742. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020157>
- 353 Nemeth, N.M., Young, G.R., Burkhalter, K.L., Brault, A.C., Reisen, W.K., Komar, N.,
354 2009. West Nile Virus Detection in Nonvascular Feathers from Avian Carcasses.
355 *J. Vet. Diagnostic Investig.* 21, 616–622.
356 <https://doi.org/10.1177/104063870902100505>
- 357 Pérez-Sautu, U., Sano, D., Guix, S., Kasimir, G., Pintó, R.M., Bosch, A., 2012. Human
358 norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain.
359 *Environ. Microbiol.* 14, 494–502. [https://doi.org/10.1111/j.1462-](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02642.x)
360 [2920.2011.02642.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02642.x)
- 361 Ramírez-Castillo, F.Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González,
362 F.J., Harel, J., Guerrero-Barrera, A.L., 2015. Waterborne Pathogens: Detection
363 Methods and Challenges. *Pathogens* 4, 307.
364 <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS4020307>

- 365 Sabrià, A., Gregori, J., Garcia-Cehic, D., Guix, S., Pumarola, T., Manzanares-Laya, S.,
366 Caylà, J.A., Bosch, A., Quer, J., Pintó, R.M., 2019. Evidence for positive selection
367 of hepatitis A virus antigenic variants in vaccinated men-having-sex-with men
368 patients: Implications for immunization policies. *EBioMedicine* 39, 348–357.
369 <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.023>
- 370 Tsoleridis, T., Chappell, J.G., Onianwa, O., Marston, D.A., Fooks, A.R., Monchatre-
371 Leroy, E., Umhang, G., Müller, M.A., Drexler, J.F., Drosten, C., Tarlinton, R.E.,
372 McClure, C.P., Holmes, E.C., Ball, J.K., 2019. Shared Common Ancestry of
373 Rodent Alphacoronaviruses Sampled Globally. *Viruses* 11, 125.
374 <https://doi.org/10.3390/v11020125>
- 375 Tsoleridis, T., Onianwa, O., Horncastle, E., Dayman, E., Zhu, M., Danjitrong, T.,
376 Wachtl, M., Behnke, J.M., Chapman, S., Strong, V., Dobbs, P., Ball, J.K.,
377 Tarlinton, R.E., McClure, C.P., 2016. Discovery of Novel Alphacoronaviruses in
378 European Rodents and Shrews. *Viruses* 8, 84. <https://doi.org/10.3390/v8030084>
- 379 Vu, D.-L., Sabrià, S., Aregall, N., Michl, K., Rodríguez Garrido, V., Gotteris, L., Bosch,
380 A., Pintó, R.M., Guix, S. Novel Human Astroviruses: Prevalence and Association
381 with Common Enteric Viruses in Undiagnosed Gastroenteritis Cases in Spain.
382 *Viruses*. 2019 Jun 27;11(7):585
- 383 Wang, W., Lin, X.-D., Guo, W.-P., Zhou, R.-H., Wang, M.-R., Wang, C.-Q., Ge, S., Mei,
384 S.-H., Li, M.-H., Shi, M., Holmes, E.C., Zhang, Y.-Z., 2015. Discovery, diversity
385 and evolution of novel coronaviruses sampled from rodents in China. *Virology*
386 474, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.10.017>
- 387 WHO, 2015. WHO | CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1) [WWW
388 Document]. URL
389 <https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/>
390 (accessed 7.16.19).
- 391 Worobey, M., 2008. Phylogenetic Evidence against Evolutionary Stasis and Natural
392 Abiotic Reservoirs of Influenza A Virus. *J. Virol.* 82, 3769–3774.
393 <https://doi.org/10.1128/JVI.02207-07>

394 **Table 1.** Summary of pH, temperature and conductivity data of Cal Tet water. Each
 395 month these three parameters were measured at time of sample collection.

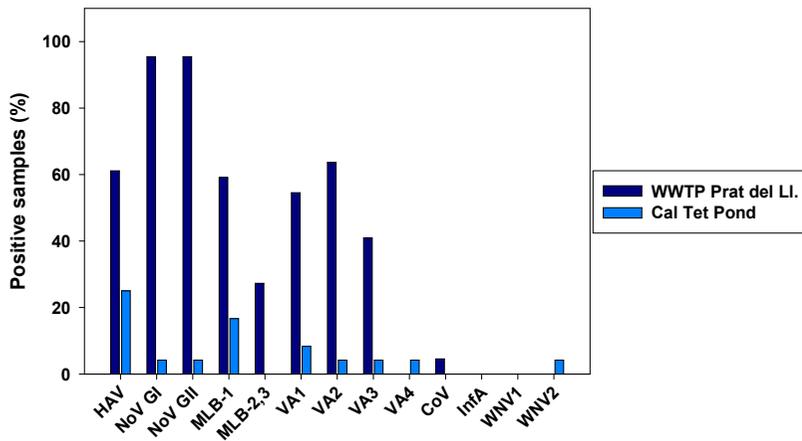
Month	pH ± SD	Temperature ± SD (°C)	Conductivity ± SD (mS)
January-March 2017	8,08 ± 0,15	16,50 ± 0,71	2,20 ± 0,07
April-June 2017	8,33 ± 0,34	22,00 ± 5,29	2,55 ± 0,23
July-September 2017	8,44 ± 0,12	23,00 ± 1,73	3,03 ± 0,11
October-December 2017	8,33 ± 0,06	11,33 ± 5,86	2,61 ± 0,09
January-March 2018	8,32 ± 0,09	9,33 ± 2,08	2,42 ± 0,11
April-June 2018	8,30 ± 0,02	24,00 ± 4,35	2,57 ± 0,07
July-September 2018	8,31 ± 0,07	26,33 ± 2,08	2,85 ± 0,06
October-December 2018	8,17 ± 0,16	15,25 ± 3,40	2,39 ± 0,15

396



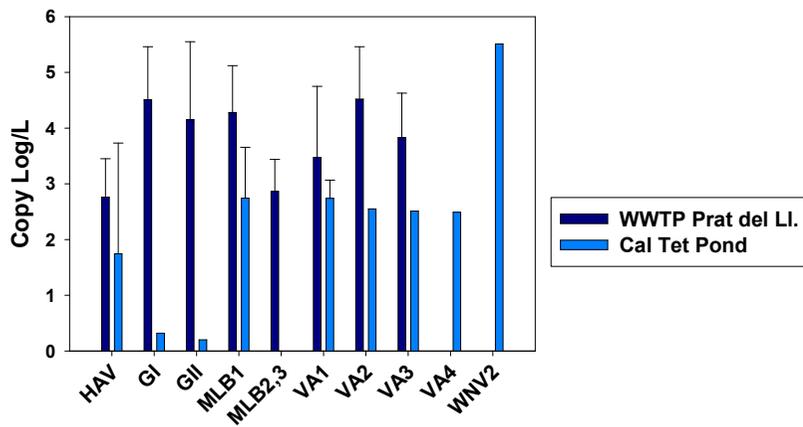
397

398 **Fig.1.** Bacteriological analysis of Cal Tet pond water. Total aerobic bacteria were always
 399 higher than *Escherichia coli* titers. Enterococci were not always found, and their numbers
 400 were in all instances really low.



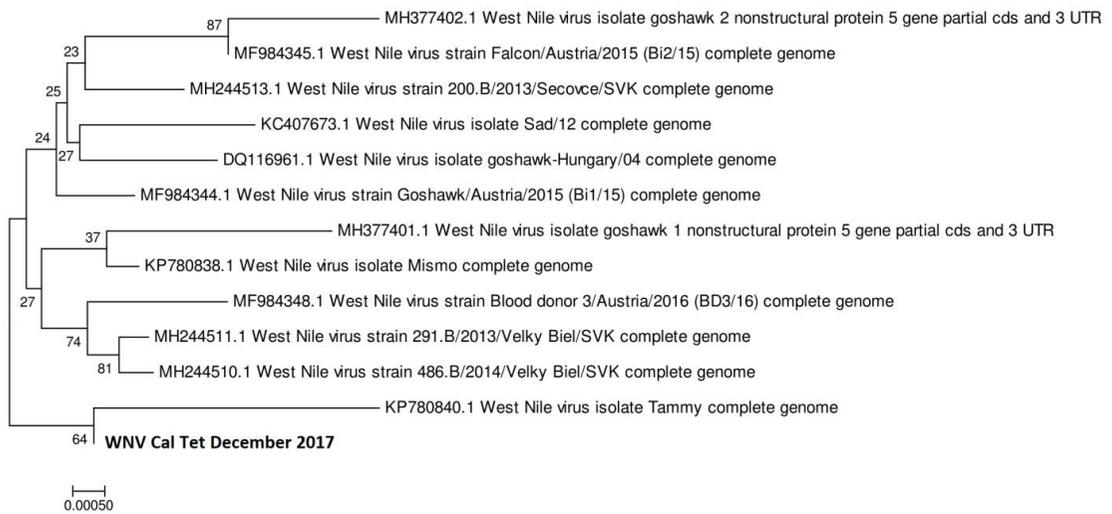
401

402 **Fig. 2.** Comparison of virus' prevalence between Cal Tet pond and Prat del Llobregat
 403 WWTP.



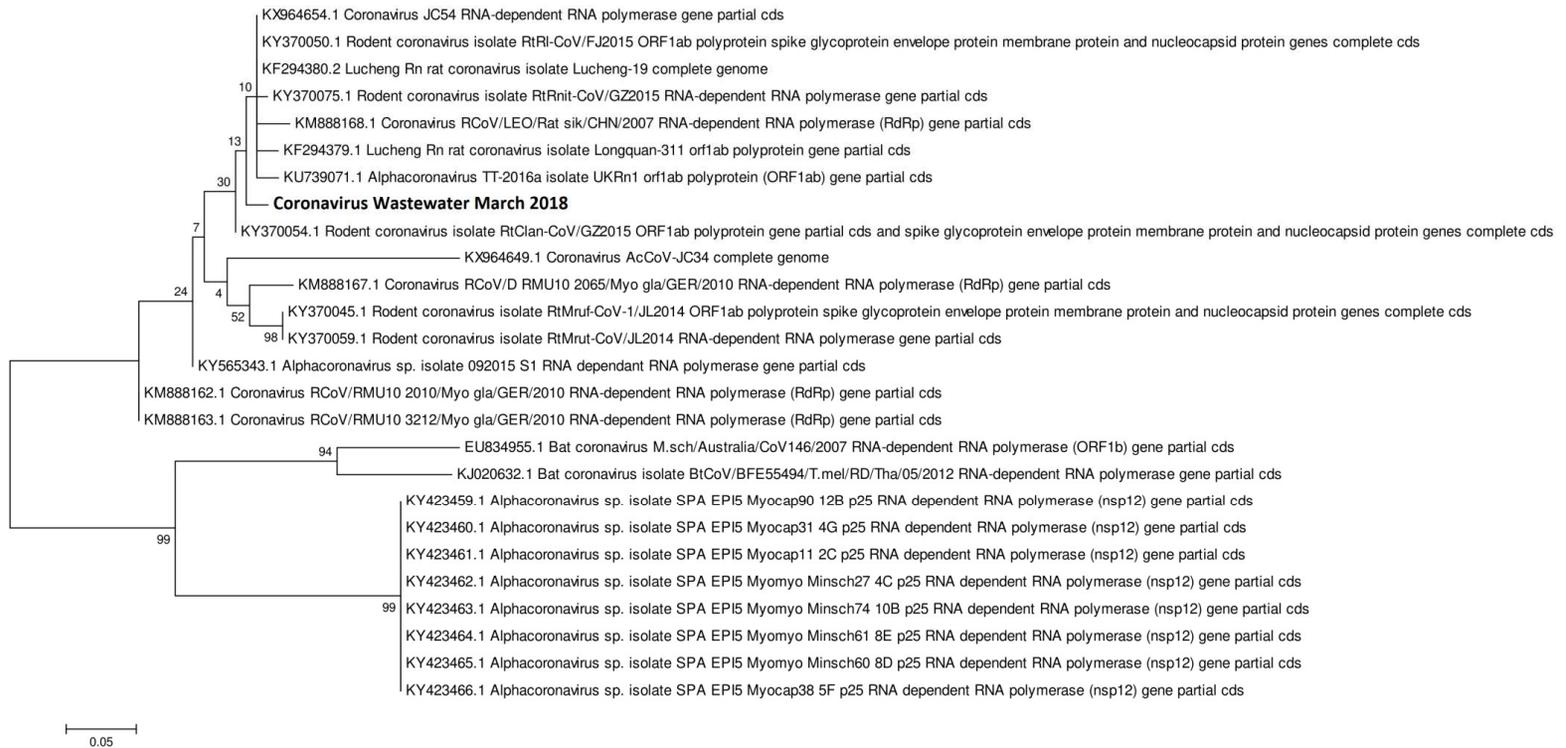
404

405 **Fig. 3.** Quantification of positive samples in wastewater and Cal Tet water. Since most
 406 of the viruses only had one positive sample in Cal Tet, no SD of the viral numbers is
 407 shown.



408

409 **Fig. 4.** West-Nile virus phylogenetic tree. The most similar sequences were from another
 410 WNV lineage 2 found mostly in birds in Europe, despite of other sequences isolated from
 411 blood donors. Phylogenetic distances are expressed as the expected number of
 412 substitutions per nucleotide site and can be estimated using the scale. The numbers
 413 adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (of 1000 replicates)
 414 for the clusters to the right of the node.



415 **Fig. 5.** Coronavirus phylogenetic tree. Our sequence is located in a clustal of novel alphacoronaviruses found in rodents, most of
 416 them rats (*Rattus norvegicus*, *Rattus losea* and *Rattus nitidus*). Phylogenetic distances are expressed as the expected number of
 417 substitutions per nucleotide site and can be estimated using the scale. The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of
 418 bootstrap support (of 1000 replicates) for the clusters to the right of the node.

4.5 - Capítulo V: Enterovirus surveillance in Barcelona wastewater, 2017-2018

Autores: **Albert Blanco**, Susana Guix, Eduard Anfruns, Damir Garcia-Cehic, Josep Quer, Albert Bosch, Rosa Maria Pintó.

En el curso del año 2016 se declaró en Cataluña un brote de EV A71 con cerca de 100 niños afectados por romboencefalitis. Poco antes del brote se detectó además otra encefalitis asociada a EV D68 en tres pacientes. Eso activó un programa de seguimiento en agua residual de los diferentes serotipos de EV que circulan por el área de Barcelona.

Desde mayo del año 2017 se recibieron aguas residuales de la entrada de la depuradora del Prat del Llobregat, que recibe buena parte de las aguas fecales de Barcelona y su área metropolitana. Mediante una concentración basada en la floculación-precipitación con PEG 6000 se pudo detectar por RT-qPCR la presencia de EV en dichas muestras. Una vez determinada su presencia/ausencia, se llevó a cabo una RT-PCR anidada para amplificar la región conservada del gen de la proteína VP1 y poder secuenciar las muestras. La secuenciación se realizó tanto con un método derivado de Sanger para determinar la secuencia consenso como con una posterior secuenciación masiva que permitió profundizar en la población de EV presente en la muestra.

La totalidad de las muestras analizadas fueron positivas para EV, con lo que en todas ellas se pudo hacer tanto la determinación de la secuencia consenso como la secuenciación masiva. La secuencia consenso mostró una hegemonía de EV B5 (anteriormente coxsackievirus B5) hasta noviembre de 2017, momento en el que se comenzó a detectar mayoritariamente otros serotipos como B9 (echovirus 9), B25 (echovirus 25) o A16 (coxsackievirus A16). La escasa variedad en la secuencia mayoritaria oculta una gran diversidad de serotipos, cuyo

número osciló desde un mínimo de 3 hasta un máximo de 18, después del análisis profundo por secuenciación masiva. En muchos casos la secuenciación masiva corroboró la secuencia consenso como la mayoritaria, si bien hubo algunos casos en los que Sanger detectó secuencias no mayoritarias. El estudio con la secuenciación masiva nos permitió ver un incremento sustancial en la diversidad de serotipos en los meses de verano, cosa que puede correlacionarse con el turismo tanto de nivel nacional como internacional. En ninguna de las muestras se encontraron secuencias correspondientes a los serotipos A71 y D68.

Tras el análisis de las muestras de aguas residuales recibidas en los años 2017 y 2018 se puede ver que tanto las secuenciaciones clásicas como las de nueva generación son dos técnicas complementarias que pueden ofrecer una gran cantidad de información y resultan extremadamente útiles para poder hacer un seguimiento en profundidad de serotipos y variantes de patógenos de interés sanitario.

1 **Enterovirus surveillance in Barcelona**
2 **wastewater, 2017-2018**

3
4 **Albert Blanco^{1,2*}, Susana Guix^{1,2*}, Eduard Anfruns-Estrada¹,**
5 **Damir Garcia-Cehic^{3,4}, Josep Quer^{3,4}, Albert Bosch^{1,2+}, Rosa M.**
6 **Pintó^{1,2+}**
7

8
9
10
11
12 ¹ Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics,
13 University of Barcelona, Barcelona, Spain.

14 ² Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

15 ³ Liver Unit, Internal Medicine Hospital Vall d'Hebron, Autonomous University of
16 Barcelona, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain.

17 ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas
18 (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

19
20 Keywords: Barcelona, Wastewater, Enterovirus, A71, D68, Water research.

21
22 * Equally contributed

23 ⁺Corresponding authors:

24 Albert Bosch, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, Diagonal
25 645, 08028, Barcelona, Spain. Tel (34) 934034620; Fax (34) 934034629; email: abosch@ub.edu

26 Rosa M Pintó, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, Diagonal
27 645, 08028, Barcelona, Spain. Tel (34) 934034621; Fax (34) 934034629; email: rpinto@ub.edu

28

29 **Abstract**

30 In 2016 the Catalan Government promoted enterovirus surveillance in hospitals and
31 wastewater due the children infected by enterovirus D68 and the large encephalitis
32 outbreak caused by enterovirus A71 in Catalonia. Since May 2017, 400 ml of wastewater
33 were concentrated by flocculation-precipitation with poly-ethylene glycol to detect the
34 presence of enteroviruses with RT-qPCR. Positive samples were amplified with a nested
35 RT-PCR targeting VP1. The resulting amplicon were firstly sequenced by a Sanger-
36 derived method to determine the consensus sequence and then deep sequencing was
37 performed to determine the enterovirus population in each sample. Results showed that
38 enterovirus A71 or D68 were absent in all samples. Most of the consensus sequences
39 obtained belonged to coxsackievirus B5, but we could also detect coxsackievirus A16
40 and echoviruses 9, 11, 24 and 25. Deep sequencing showed us large variety in enterovirus
41 population oscillating from 3 to 18 different detectable serotypes. The lowest number of
42 serotypes were detected in May, July and December 2017, whereas August 2018 had the
43 maximum number of serotypes found. In general, 2017 samples had lesser serotype
44 diversity than 2018 samples, and more serotypes were detected in warmer months than
45 in colder months, maybe due to tourism. Our work demonstrates that classic sanger and
46 deep sequencing methods are both useful since they enable to gather complementary data
47 of the same sample.

48

49 **Introduction**

50 The genus *Enterovirus* comprises a wide variety of picornaviruses classified in
51 up to 15 species (Enterovirus A-L and Rhinovirus A-C) and more than 300 serotypes.
52 Some of these viruses such as Rhinovirus and Enterovirus D can be airborne, but most
53 are waterborne pathogens. Human pathogens are comprised in rhinovirus and enterovirus
54 A-D species, and every year around 1 billion people are infected by enteroviruses
55 worldwide (Bracho et al., 2011). Usually people infected with enteroviruses curse with
56 asymptomatic infection or develop a cold-like disease that may lead to a self-limiting
57 mild illness lasting for 5 to 7 days (Nikonov et al., 2017). Nevertheless, a small part of
58 the infected people can develop, due to the wide tropisms of enteroviruses, several
59 diseases, i.e. hand, foot and mouth disease (HFMD), myocarditis, pericarditis,
60 hemorrhagic conjunctivitis, encephalitis, meningitis and even acute flaccid paralysis
61 (AFP) (Bracho et al., 2011; Cortina et al., 2018; Lugo and Krogstad, 2016; Medina et al.,
62 2016; Nikonov et al., 2017; Suresh et al., 2018).

63 A single serotype of enterovirus can infect different tissues and cause different diseases,
64 depending on the host health and the variety of receptors the virus can use. The high
65 percentage of asymptomatic cases and serotype diversity makes difficult to control
66 enteroviruses. Therefore, surveillance is one of the best approaches for prevention and
67 managements of enterovirus outbreaks.

68 In 2016 a large encephalitis outbreak caused by enterovirus A71 occurred, with
69 near 100 children affected by the disease (Casas-Alba et al., 2017; González-Sanz et al.,
70 2019). Just a few weeks earlier, another children was infected by a D68 serotype. Despite
71 being mainly respiratory as the rest of Enterovirus D serotypes, D68 was described as an
72 emergent pathogen that can cause a polio-like disease (Cassidy et al., 2018; Messacar et
73 al., 2016). Being the second common cause of viral encephalitis, in recent years there
74 were several outbreaks caused by other enterovirus serotypes that affected children
75 around the world; the reports showed that also coxsackievirus but mostly echovirus were
76 the causal agents when EV A71 and D68 are not involved (Chen et al., 2017; Messacar
77 et al., 2018; Singh et al., 2016). The 2016 outbreak led the Catalan Government to

78 enhance enterovirus surveillance in wastewater and hospitals with the aim to know which
79 serotypes are circulating in Barcelona and surrounding areas. Since May 2017 raw
80 wastewater samples were collected at the Prat del Llobregat Wastewater Treatment Plant
81 (WWTP) to detect and identify enteroviruses circulating among the population.

82 In our work enteroviruses were screened in wastewater samples by RT-qPCR.
83 Positive samples were then sequenced by Sanger-derived method and by deep-
84 sequencing to ascertain the consensus sequence and the total enterovirus population
85 present in the sample, respectively.

86 **Material and methods**

87 **Wastewater sample collection**

88 Every month, 1L of untreated wastewater coming collected at the Prat del Llobregat
89 WWTP was collected by Aigües de Barcelona and transported to our facilities for storing
90 at 4°C until further processing. Wastewater samples were collected from May 2017 to
91 December 2018. With the exception of 3 samples collected in May 2017, one monthly
92 sample was collected.

93 **Sample concentration**

94 Viruses in wastewater were recovered from 400-ml samples by a flocculation-
95 precipitation method with Poly-ethylene glycol (PEG) 6000. Since the original
96 concentration method does not allow removal of all inhibitors in the total nucleic acid
97 extraction, the method was modified. First, we added 50 ml of Glycine Beef Extract
98 (GBE) Buffer, pH 9.5 to the 400 ml of wastewater. After 2h of incubation at 4°C in
99 agitation, a preliminary centrifugation was performed at 8000xg for 30 minutes,
100 maintaining the sample at 4°C during the spin. With this centrifugation we remove part
101 of the particles present in wastewater.

102 Following the centrifugation, the supernatant was recovered and 20% of PEG 6000 and
103 0.3M of NaCl added to start the overnight flocculation. During the process, the sample is
104 also maintained at 4°C with agitation (~300 rpm). Precipitation is performed by a second

105 centrifugation at 10000xg during 90 minutes at 4°C. The supernatant is discarded, and
106 the pellet resuspended in 1ml of PBS. Finally, the sample is subjected to a sonication at
107 0,5x cycles and 100% amplitude to detach viruses from the PEG, followed by a final
108 centrifugation at room temperature at 3000xg during 15 minutes. The supernatant is
109 recovered and stored at -80°C until nucleic acid extraction.

110 **Nucleic acid extraction**

111 Total RNA was extracted from 1 ml of the sample using NucliSENS® miniMAG®
112 extraction system (Biomérieux), to a final elution in 50 µl. The process was performed
113 by following the manufacturer's instructions. When we could not proceed immediately
114 with the analysis, RNA was stored at -80°C.

115 **Virus detection and sequencing**

116 Enterovirus presence were screened in all samples prior to sequencing by adapting a RT-
117 qPCR assay targeting the conserved sequence located in the 5'UTR of all enteroviruses
118 (Selva et al., 2012). Briefly, primer and probe concentrations, as well as RT-qPCR
119 protocol were as described, only using INVITROGEN RNA UltraSense One-Step
120 Quantitative RT-PCR System instead of the QIAGEN RT-PCR kit.

121 The RT-qPCR was only employed for virus detection, not quantification. For this latter,
122 only direct and -1 dilution of samples were tested along with the extraction and PCR
123 negative controls, employing a laboratory-adapted Echovirus 30 RNA as positive control.

124 Positive samples were sequenced to identify the most prevalent enterovirus in wastewater
125 by using a nested RT-PCR, targeting a conserved region of the VP1. All primers, cycles
126 and reagents used were previously described (Nix et al., 2006, WHO, 2015), with the
127 exception of the reverse transcription, performed using SuperScript IV reverse
128 transcriptase (INVITROGEN) instead of SuperScript II. The final product ranged
129 between 349 and 400 pb depending on the enterovirus detected. The second PCR product
130 was sequenced by a Sanger-derived method to characterize the major enterovirus present
131 in all positive samples.

132 **Deep sequencing of wastewater samples**

133 Since the consensus sequence does not provided us with much information, and some
134 interesting enteroviruses could be present in minor proportions, we decided to detect all
135 serotypes present in each positive wastewater sample by deep sequencing. PCR products
136 were purified after an electrophoresis with 1x TAE (Roche Premixed TAE Buffer, 10x).
137 Finally, the PCR product was extracted from the agarose and purified by using Macherey-
138 Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean Up kit, following manufacturer's instructions. The
139 purified PCR products were sequenced (Illumina MiSeq) at the Viral Hepatitis
140 Laboratory of the Vall d'Hebron Research Institute.

141 **Results**

142 **Water sample analysis**

143 The RT-qPCR screening allowed us to ascertain that all wastewater samples were
144 positive for enteroviruses. The consensus sequence of all samples is depicted in table 1.
145 The first May 2017, February 2018 and April 2018 samples had a consensus sequence
146 too difficult to obtain, whereas the rest of the samples could be characterized. We
147 observed a high prevalence of Enterovirus B5 (formerly Coxsackievirus B5) from May
148 2017 to November 2017, being also the consensus sequence in two 2018 samples (10 out
149 of 19 sequenced samples). The other consensus sequences were as follows; 3 of them
150 were identified as Enterovirus B9 (Echovirus 9), 2 were Enterovirus B11 (Echovirus 11),
151 another 2 were characterized as Enterovirus B25 (Echovirus 25), and finally the other 2
152 samples were Enterovirus B24 (Echovirus 24) and Enterovirus A16 (Coxsackievirus
153 A16). In conclusion, most of the Enterovirus serotypes present in Barcelona's wastewater
154 belonged to Enterovirus B species. We must mention that the sample from August 2018
155 (identified as Echovirus 24) was extremely difficult to characterize since the sequence
156 demonstrated the presence of a large variety of viruses.

157 The consensus sequences alignment is shown in Fig 1, adding other interesting
158 enteroviruses such as Enterovirus A71 and D68 to elucidate their distance from our
159 sequences. In the phylogenetic tree we also include other sequences of the detected
160 enteroviruses.

161 **Enterovirus deep sequencing**

162 Since only 6 out of hundreds of Enterovirus serotypes were found in wastewater, deep
163 sequencing allowed us to reveal the presence and dynamics of other interesting serotypes
164 undetectable through classic sequencing for being minoritarian. Our results show a great
165 diversity in both number and types of enteroviruses present in wastewater. The total
166 number of serotypes detected ranged between 3 and 17. This lowest diversity was found
167 in May, July and December 2017, whereas the belonged to August 2018. Deep
168 sequencing allowed us to identify the samples we could not characterize with the Sanger-
169 derived sequencing.

170 Some of the samples consensus sequences did not belong to the most common serotype
171 evidenced by deep sequencing, as we can see, for example, in June 2017, October 2017,
172 January 2018 and June 2018, or even was not present in the population, resulting the
173 misclassified virus from a mix of sequence from two or more viruses present in the
174 sample such in December 2017 or August 2018. The Enteroviruses population detected
175 in deep sequencing is summarized in Fig. 2 and Fig. 3 for 2017 and 2018, respectively.

176 **Discussion**

177 Whereas consensus sequence only detects usually the most common sequence and brings
178 limited information, deep sequencing is a powerful and useful technique to detect viruses
179 present in low concentrations in a sample in which otherwise they could not be detected,
180 providing large amounts of sequences critical to understand in the characteristics of the
181 sample. Deep sequencing is commonly used in clinical samples (Casadellà and Paredes,
182 2017; Quiñones-Mateu et al., 2014), but it may also be applied in food and water matrices
183 (Bartsch et al., 2018; Jacob et al., 2017; Li et al., 2017). In addition, , when used in the
184 same type of sample in different days, weeks or months it enables to elucidate the
185 population dynamics of viruses in this sample.

186 In wastewater samples viruses are present in high concentrations and its high diversity
187 cannot be clarified with just a consensus sequence. When a sample had multiple
188 genotypes, or many of them had similar prevalences, consensus sequence can determine
189 a false serotype that is not present in the sample – as we had in August 2018 – or could

190 not be determined. Deep sequencing allowed us to gather information about these
191 samples that otherwise would be impossible to obtain.

192 The Sanger-derived method only showed six genotypes during all the wastewater
193 screening, but in a large, touristic city, receiving many visitors, like Barcelona, the
194 enterovirus population is always changing not only because of infections circulating
195 among the population or diet changes of people, but also for the introduction of viruses
196 by people coming from other parts of the globe. Due to the large size of the Barcelona
197 population, above 1.5 million people, the impact of tourism in the enterovirus population
198 dynamics can only be screened through deep sequencing.

199 Deep sequencing is a useful tool to study fluctuations in the diversity. As we could see
200 in our analyzed samples, 2017 samples showed less diversity than 2018 samples; the
201 number of genotypes samples ranged from 3 to 8 in 2017 whereas they ranged from 5 to
202 17 in 2018 samples. The high enterovirus diversity in November 2017 compared with the
203 rest of 2017 samples can be explained by the fact that October was the rainiest month in
204 2017 (with a total amount of rain of 101.4 mm) and the November sample was collected
205 on the 7th. The rainwater could have washed out viruses attached to organic material
206 accumulated in the sewers. As we commented above, the high diversity in August may
207 result from tourism.

208 Since enteroviruses develop mostly as asymptomatic infections, the absence of
209 enteroviruses A71 and D68 clinical cases does not imply these viruses were not present
210 among the population. The aim of using deep sequencing was to monitor the possible
211 occurrence of A71 or D68 present in low concentrations in wastewater samples, but
212 Sanger sequencing nor deep sequencing detected any Enteroviruses A71 and D68 in
213 wastewater during the sampling period.

214 **Conclusions**

215 Wastewater samples are a highly complex matrix and those from Barcelona are
216 no exception. Barcelona wastewater constitutes a highly dynamic environment to study
217 the virus population present in it. Enterovirus diversity is continuously fluctuating in

218 Barcelona wastewater, with the most prevalent viruses being genotypes included in
219 Enterovirus B species. Nevertheless, up to 32 genotypes were found through all the
220 sampling period. The key factors affecting the population dynamics seems to be heavy
221 rains and tourism since the main increases in diversity were detected after pouring rains
222 during 2017 and in summer during 2018.

223 Despite the number of genotypes per sample, it is common that the first two genotypes
224 comprise 70-90% of the sequences found in deep sequencing. Genotypes recently related
225 with encephalitis were not found either in Sanger sequencing nor deep sequencing. Also,
226 there were no close-related genotypes in wastewater during the sampling period. Since
227 in most cases Enteroviruses develops mild illnesses or even an asymptomatic infection,
228 is possible that genotypes A71 and D68 were present in extremely low concentration
229 (below 0.05%) that makes them undetectable even with deep sequencing.

230 Usually the most prevalent virus in the sample represents more than 50% of all sequences
231 found employing deep sequencing, but in some cases the consensus sequence could be
232 other than the most representative. Additionally, when 2 or more genotypes had similar
233 numbers in a sample, the consensus sequence could not be determined or corresponded
234 to a virus that was not even present in the sample. Consequently, Sanger-derived
235 sequencing and deep sequencing could be used to compare and complement information
236 obtained through both approaches from the same sample.

237 **References**

238 Bartsch, C., Höper, D., Mäde, D., Johne, R., 2018. Analysis of frozen strawberries
239 involved in a large norovirus gastroenteritis outbreak using next generation
240 sequencing and digital PCR. *Food Microbiol.* 76, 390–395.
241 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.019>

242 Bracho, M.A., González-Candelas, F., Valero, A., Córdoba, J., Salazar, A., 2011.
243 Enterovirus Co-infections and Onychomadesis after Hand, Foot, and Mouth
244 Disease, Spain, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2223–2231.
245 <https://doi.org/10.3201/eid1712.110395>

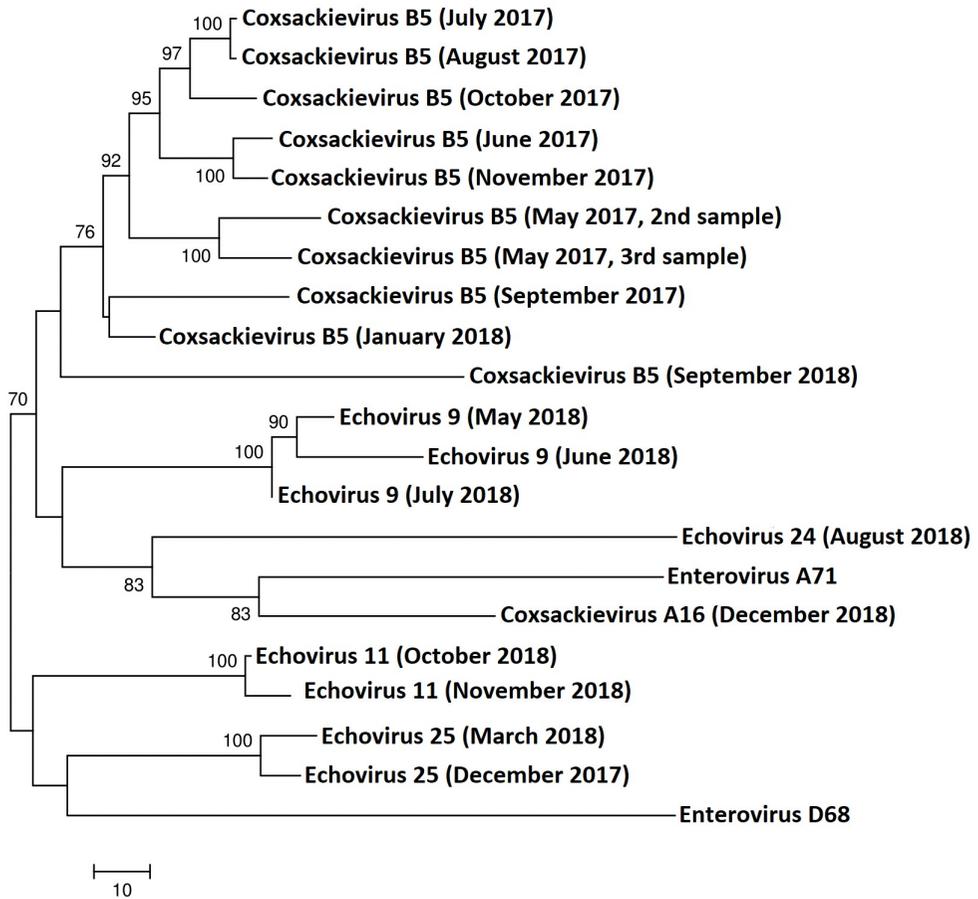
246 Casadellà, M., Paredes, R., 2017. Deep sequencing for HIV-1 clinical management. *Virus*
247 *Res.* <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.019>

- 248 Casas-Alba, D., de Sevilla, M.F., Valero-Rello, A., Fortuny, C., García-García, J.-J.,
 249 Ortez, C., Muchart, J., Armangué, T., Jordan, I., Luaces, C., Barrabeig, I.,
 250 González-Sanz, R., Cabrerizo, M., Muñoz-Almagro, C., Launes, C., 2017.
 251 Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia,
 252 Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in
 253 Catalonia. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 874–881.
 254 <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016>
- 255 Cassidy, H., Poelman, R., Knoester, M., Van Leer-Buter, C.C., Niesters, H.G.M., 2018.
 256 Enterovirus D68 – The New Polio? *Front. Microbiol.* 9, 2677.
 257 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02677>
- 258 Chen, X., Li, J., Guo, J., Xu, W., Sun, S., Xie, Z., 2017. An outbreak of echovirus 18
 259 encephalitis/meningitis in children in Hebei province, China, 2015. *Emerg.*
 260 *Microbes Infect.* 6, e54. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.39>
- 261 Cortina, G., Best, D., Deisenberg, M., Chiletto, R., Butt, W., 2018. Extracorporeal
 262 membrane oxygenation for neonatal collapse caused by enterovirus myocarditis.
 263 *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 103, F370–F376.
 264 <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-312429>
- 265 González-Sanz, R., Casas-Alba, D., Launes, C., Muñoz-Almagro, C., Ruiz-García,
 266 M.M., Alonso, M., González-Abad, M.J., Megías, G., Rabella, N., Del Cuerpo,
 267 M., Gozalo-Margüello, M., González-Praetorius, A., Martínez-Sapiña, A.,
 268 Goyanes-Galán, M.J., Romero, M.P., Calvo, C., Antón, A., Imaz, M.,
 269 Aranzamendi, M., Hernández-Rodríguez, Á., Moreno-Docón, A., Rey-Cao, S.,
 270 Navascués, A., Otero, A., Cabrerizo, M., 2019. Molecular epidemiology of an
 271 enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain,
 272 2016. *Euro Surveill.* 24. [https://doi.org/10.2807/1560-](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089)
 273 [7917.ES.2019.24.7.1800089](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089)
- 274 Jacob, J.H., Hussein, E.I., Shakhathreh, M.A.K., Cornelison, C.T., 2017. Microbial
 275 community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-
 276 throughput amplicon sequencing. *Microbiologyopen* 6.
 277 <https://doi.org/10.1002/mbo3.500>
- 278 Li, R., Tun, H.M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Fernando, D., Farenhorst, A.,
 279 Khafipour, E., 2017. Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA
 280 Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Sci. Rep.* 7.
 281 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02516-3>
- 282 Lugo, D., Krogstad, P., 2016. Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations
 283 and challenges. *Curr. Opin. Pediatr.* 28, 107–13.
 284 <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000303>
- 285 Medina, N.H., Haro-Muñoz, E., Pellini, A.C., Machado, B.C., Russo, D.H., Timenetsky,
 286 M. do C., Carmona, R. de C.C., 2016. Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic
 287 in São Paulo State, Brazil, 2011. *Rev. Panam. Salud Publica* 39, 137–141.

- 288 Messacar, K., Abzug, M.J., Dominguez, S.R., 2016. The Emergence of Enterovirus-D68.
289 Microbiol Spectr 4, 105–119. [https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0018-](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0018-2016)
290 2016
- 291 Messacar, K., Fischer, M., Dominguez, S.R., Tyler, K.L., Abzug, M.J., 2018.
292 Encephalitis in US Children. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 32, 145–162.
293 <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.10.007>
- 294 Nikonov, O.S., Chernykh, E.S., Garber, M.B., Nikonova, E.Y., 2017. Enteroviruses:
295 Classification, diseases they cause, and approaches to development of antiviral
296 drugs. *Biochem.* 82, 1615–1631. <https://doi.org/10.1134/S0006297917130041>
- 297 Nix, W.A., Oberste, M.S., Pallansch, M.A., 2006 Sensitive, seminested PCR
298 amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus
299 serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* Aug;44(8):2698-704.
300 <https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06>.
- 301 Quiñones-Mateu, M.E., Avila, S., Reyes-Teran, G., Martinez, M.A., 2014. Deep
302 sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology. *J. Clin. Virol.*
303 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.013>
- 304 Selva, L., Martines-Planas, A., García-García, J-J., Casadevall, R., Luaces, C., Muñoz-
305 Almagro, C., 2012. Comparison of an in-house real-time RT-PCR assay with a
306 commercial assay for detection of enterovirus RNA in clinical samples. *Eur J Clin*
307 *Microbiol Infect Dis.* May;31(5):715-9. [https://doi.org/10.1007/s10096-011-1364-](https://doi.org/10.1007/s10096-011-1364-1)
308 1
- 309 Singh, D.V., Kumar, A., Pramesh Kumar, •, Manjari Baluni, •, Ghildiyal, S., Kumar, R.,
310 Misra, U.K., Tapan, •, Dhole, N., 2016. An outbreak of encephalitis associated
311 with echovirus 19 in Uttar Pradesh, India, in 2011. *Arch. Virol.* 161, 967–970.
312 <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2714-6>
- 313 Suresh, S., Forgie, S., Robinson, J., 2018. Non-polio Enterovirus detection with acute
314 flaccid paralysis: A systematic review. *J. Med. Virol.* 90, 3–7.
315 <https://doi.org/10.1002/jmv.24933>
- 316 WHO, 2015. WHO | CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1) [WWW
317 Document]. URL
318 <https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/>
319 (accessed 7.16.19).
- 320

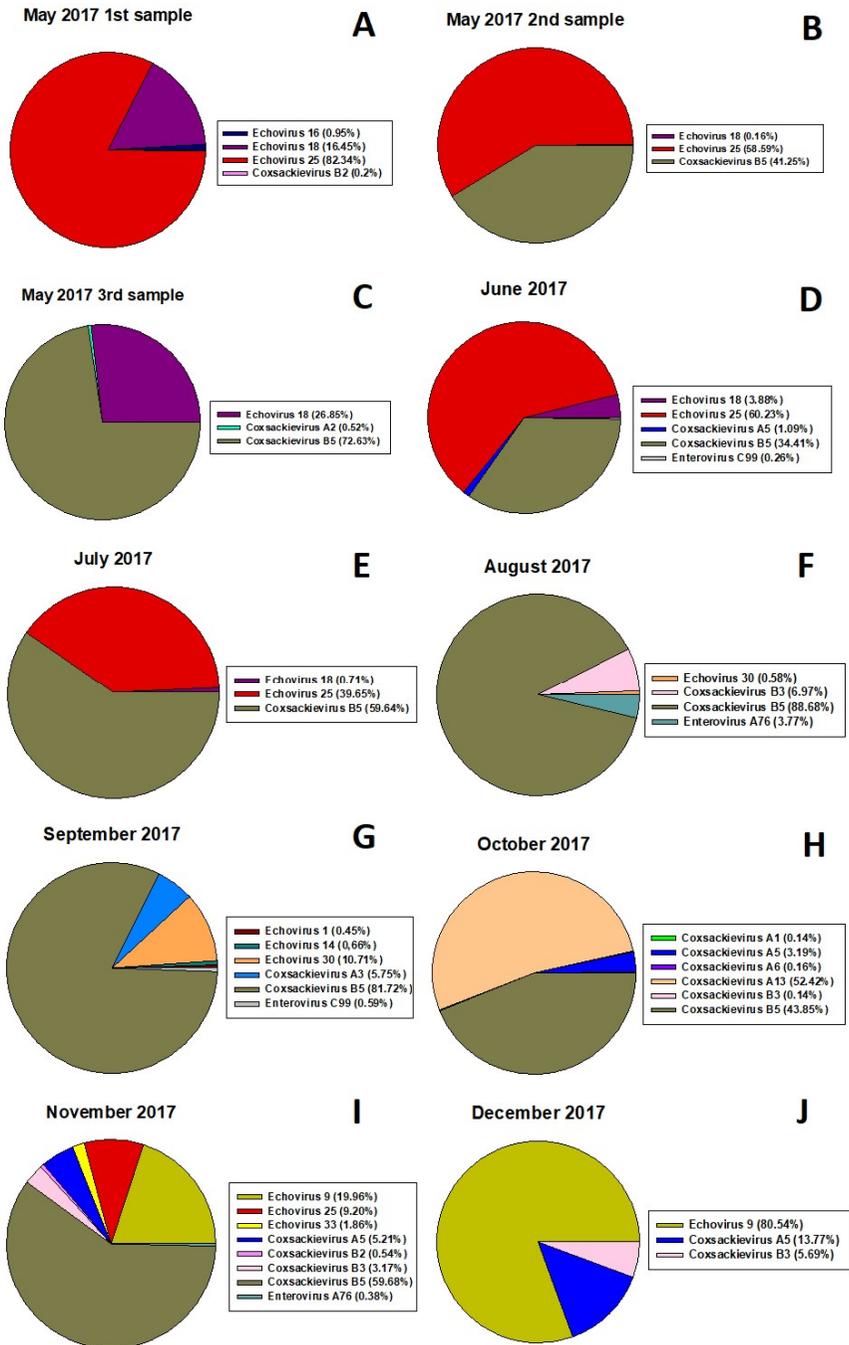
321 **Table 1:** Consensus sequences of all the wastewater samples analyzed for
 322 enteroviruses.

MONTH	CONSENSUS SEQUENCE	MONTH	CONSENSUS SEQUENCE
MAY 2017 (1)	Non identified	FEBRUARY 2018	Non identified
MAY 2017 (2)	Enterovirus B5	MARCH 2018	Enterovirus B25
MAY 2017 (3)	Enterovirus B5	APRIL 2018	Non identified
JUNE 2017	Enterovirus B5	MAY 2018	Enterovirus B9
JULY 2017	Enterovirus B5	JUNE 2018	Enterovirus B9
AUGUST 2017	Enterovirus B5	JULY 2018	Enterovirus B9
SEPT. 2017	Enterovirus B5	AUGUST 2018	Enterovirus B24
OCT. 2017	Enterovirus B5	SEPT. 2018	Enterovirus B5
NOV. 2017	Enterovirus B5	OCT. 2018	Enterovirus B11
DEC. 2017	Enterovirus B25	NOV. 2018	Enterovirus B11
JANUARY 2018	Enterovirus B5	DEC. 2018	Enterovirus A16



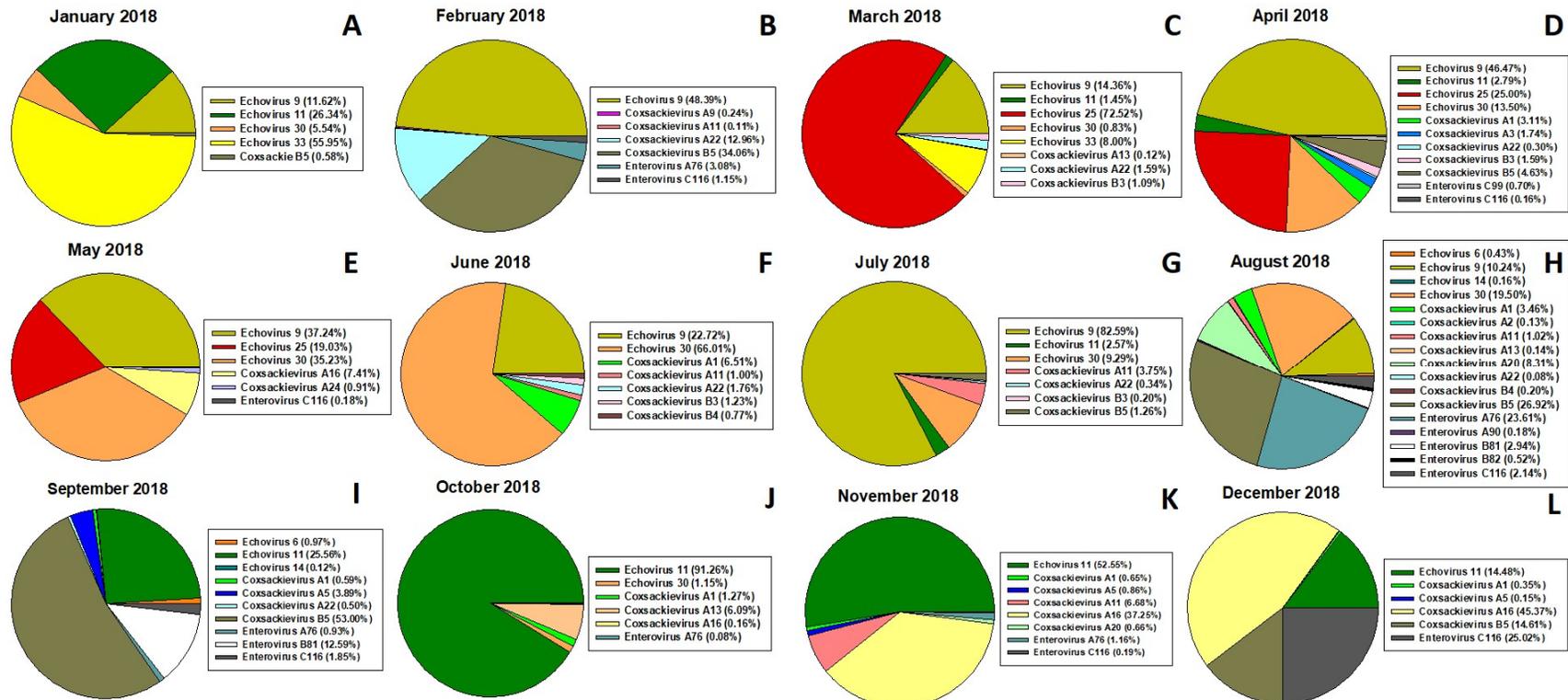
323
 324
 325
 326
 327
 328

Fig. 1.: Wastewater consensus sequence phylogenetic tree. Phylogenetic distances are expressed as the expected number of substitutions per nucleotide site and can be estimated using the scale. The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (of 1000 replicates) for the clusters to the right of the node. Old nomenclature is used for better understanding.



329

330 **Fig. 2.** Enterovirus types circulating in Catalonia during 2017. Usually 5 or less
 331 enterovirus genotypes were found. The highest diversity was found between
 332 September and November. Old nomenclature is used for better understanding.



333

334 **Fig. 3.** Enterovirus population during 2018. Samples had higher diversity in 2018 than in 2017, with the highest number of genotypes
 335 found in August. The most prevalent serotypes this year were more variable than 2017, alternating from two coxsackievirus to five
 336 echovirus serotypes. Old nomenclature is used for better understanding.

5 - DISCUSIÓN

Desde el punto de vista epidemiológico, los principales agentes víricos de transmisión fecal-oral cuyo ciclo los lleva a contaminar el medio acuático son el virus de la hepatitis A (HAV) y norovirus (NoV). El HAV es un virus altamente resistente a la inactivación que causa una enfermedad asintomática en niños menores de cinco años, y cuya vacuna ha permitido reducir su incidencia en varias partes del mundo., La distribución de HAV se divide en regiones de alta, media o baja endemicidad, lo cual está también relacionado con la capacidad de saneamiento de los diferentes países [84,121,122,251]. Por su parte, los NoV poseen una gran variabilidad que se traduce en un gran número de genotipos. Constituyen la primera causa de gastroenteritis vírica. Pese a tratarse de una enfermedad leve, lo cual contribuye a que su incidencia se vea subestimada, se detectan decenas de casos por 100.000 habitantes cada año [252]. La inexistencia de vacuna también incide en que NoV a día de hoy siga teniendo una distribución mundial, alcanzando los elevados números mencionados.

Además de HAV y NoV, existen muchos otros patógenos, algunos con un significativo potencial zoonótico, que pueden ser detectados en aguas. En nuestro estudio destacaron los virus envueltos, y entre los susodichos los coronavirus centraron la atención del trabajo debido a la relevancia del SARS y el MERS. Durante la escritura de la tesis doctoral ha emergido el patógeno SARS-CoV-2, agente causal de la COVID-19, provocando la pandemia que a día de hoy todavía tiene en jaque al mundo.

El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus cuyo origen se encuentra en China y que se detectó con el brote inicial de COVID-19 en la ciudad de Wuhan, la capital de la provincia de Hubei en diciembre de 2019 [235] y que a día de hoy se ha extendido por todo el globo. Al igual que el SARS-CoV original (SARS-CoV1), patógeno del cual debe su nombre dada su similitud filogenética, es capaz de provocar una neumonía que da lugar un síndrome respiratorio agudo severo en el que se puede detectar otros síntomas como la fatiga, y el distrés respiratorio,

o también la famosa tormenta de citoquinas. Pero en la mayoría de casos la enfermedad presenta un cuadro leve en el que la fiebre y la tos seca son los principales síntomas. Asimismo, es capaz también de provocar síntomas neurológicos en las personas infectadas, tales como encefalitis, mielitis o enfermedades cerebrovasculares [253,254].

A la fecha de la escritura de la discusión más de 100 millones de personas han resultado infectadas por el virus, y más de un millón han fallecido. De los casos que hay detectados y en curso sólo un 1% han presentado el cuadro clínico severo de la enfermedad.

La emergencia del SARS-CoV-2, así como su capacidad de ser excretado por las heces y llegar al medio acuático, han puesto en relieve la importancia de adaptar los métodos de concentración de aguas para la detección de virus para poder determinar también la presencia de aquellos con envuelta.

Caracterización de virus asociados a brotes de transmisión hídrica y caracterización mediante secuenciación masiva.

El primer artículo publicado relativo al trabajo realizado en la tesis doctoral utiliza el método de filtración por lana de vidrio con la subsiguiente floculación-precipitación con polietilenglicol (PEG) 6000 [7,8,11] que el grupo ha llevado a cabo durante años para la detección y caracterización de virus sin envuelta tanto en aguas de río como de consumo. Pese a que su capacidad de filtración depende de las partículas en suspensión de la muestra - motivo por el cual las aguas residuales no se pueden procesar con este método - resulta práctico dado el poco coste que requiere procesar la muestra.

Mientras no se dispuso del método de filtración por lana de vidrio optimizado para adaptarlo a las nuevas necesidades que implicaban la presencia de virus envueltos de gran importancia sanitaria en aguas crudas – aspecto en el que haremos hincapié en el siguiente apartado de la discusión – se utilizó el método que ahora denominamos clásico, descrito en las referencias anteriores, para la detección de los virus entéricos clásicos. Durante el período experimental de tesis solamente hubo un brote de alto interés de transmisión hídrica, provocado por norovirus en abril de 2016, que llegó a causar 4136 casos.

Norovirus se transmite principalmente por alimentos contaminados o por el contacto persona-persona en los países desarrollados, dejando la transmisión estrictamente hídrica – es decir, consumo de agua contaminada – como un fenómeno anecdótico, pero que sigue siendo una vía de transmisión importante en países en vías de desarrollo. El hecho de que se sospechara del agua embotellada como medio de transmisión del virus fue el principal motivo por el que el brote de abril de 2016 tuvo mucha más relevancia sanitaria que otros brotes de norovirus que se dieran en los últimos años. En este caso las garrafas con el agua contaminada se llegaron a distribuir a 925 empresas diferentes, provocando así el brote a gran escala que se declaró.

Otro de los puntos más relevantes del brote fue que los genotipos aislados en las muestras de heces de las personas infectadas fueron norovirus GI.2 y GII.17, siendo este último genotipo el que más llamó la atención. Norovirus GII.17 es un genotipo que, si bien lleva décadas descrito, hasta hace unos años se veía relegado a un genotipo de escasa frecuencia debido a la predominancia del genotipo GII.4 con capacidad de generar nuevas variantes cada dos o tres años, lo cual lo mantuvo como el mayor causante de casos y brotes a nivel mundial [255,256]. Sin embargo, desde finales de 2014 NoV GII.17 se ha convertido en un genotipo emergente que ha desplazado al genotipo GII.4 en países como Kenia, China y Japón [257,258]. El hecho de que se detectara mayoritariamente el

genotipo GII.17 en heces de pacientes del brote de abril de 2016 –pese a que también se hallaron los genotipos GI.2, GII.2 y GII.4 Sydney 2012 – llamó la atención dado que podría significar que GII.4 comenzara a ser desplazado como principal genotipo de norovirus también en España.

Las cuatro muestras que se analizaron se clasificaron en dos grupos; el primer grupo fueron dos muestras que provenían de una empresa con casos declarados, mientras que el segundo dúo venía de otra empresa en la que no se conocían casos de gastroenteritis por norovirus. El método de concentración fue exactamente el mismo, con la única diferencia del volumen de partida de cada muestra, variando de 2L a 7.8L. Como cabría esperar, solamente se detectó la presencia de norovirus en la pareja de muestras que provenía de una empresa donde se declararon casos, dando negativas las otras dos muestras.

En ambas muestras positivas se detectaron altos niveles de genomas tanto de NoV GI como de NoV GII por RT-qPCR, que nos animó a intentar secuenciar los genomas detectados mediante la RT-PCR semianidada descrita en el artículo. No se pudo detectar la secuencia consenso de NoV GI pese a los niveles detectados en la RT-qPCR probablemente debido a que parte de los genomas de la muestra estuvieran fragmentados, impidiendo la amplificación de la secuencia de genotipado. En cuanto a NoV GII, la secuencia consenso coincidía con el genotipo GII.4, concretamente la variante GII.4/Sydney/2012.

Ese dato fue complementado con una posterior secuenciación masiva a partir del amplificado. La secuenciación en profundidad (deep sequencing) llevada a cabo detectó solamente variantes de la secuencia de NoV GII.4/Sydney/2012. Los motivos que pueden llevar a ello son varios. Podría deberse a que las diversas muestras del lote contaminado contenían una población no homogenizada de virus, a que se perdieran los viriones con el genoma del genotipo GII.17 durante la concentración de virus o que la región

diana de la PCR de genotipado se encontrara fragmentada en los viriones con el genotipo GII.17, favoreciendo que se amplificara GII.4/Sydney/2012. Asimismo, es posible que, tras los años de circulación de la variante GII.4/Sydney/2012 se haya generado una cierta inmunidad en la población, haciendo que esta variante sea desplazada por otras cepas de NoV GII, como anteriormente la variante GII.4/New Orleans/2009 fue reemplazada por la variante GII.4/Sydney/2012 [259].

El alto nivel de norovirus detectado en las muestras, nos animó a llevar a cabo, adicionalmente, un tratamiento con monoazida de propidio (PMA, por sus siglas en inglés). El PMA es un agente intercalante del ácido nucleico que se fotoactiva con luz azul, generando enlaces covalentes con el DNA o RNA al que se adhiere, impidiendo así su replicación en las PCR. Esta molécula destaca por ser incapaz de atravesar membranas plasmáticas y cápsides víricas [260,261]. Gracias a ello el PMA nos permite una aproximación, en nuestro caso, a la infectividad de la muestra procesada.

El tratamiento con PMA demostró que buena parte de los genomas detectados provenían de cápsides dañadas. El porcentaje de partículas infecciosas fueron del 4.45% para NoV GI y 5.64% para NoV GII en la muestra 1, y del 0.33% para NoV GI y del 2.75% para NoV GII en la muestra 2. Para ambos genogrupos se puede observar una mayor estabilidad de cápsides en la muestra 1 que en la muestra 2, si bien es cierto que el número de genomas detectados en la muestra con mayor estabilidad era menor. Pese a la drástica caída de genomas detectados tras el tratamiento con PMA, los niveles restantes eran suficientes como para provocar gastroenteritis por norovirus con apenas ingerir un vaso del agua contaminada, lo cual contribuyó a que se declarara el brote.

Optimización del método de concentración por lana de vidrio para recuperar en aguas crudas tanto virus desnudos como envueltos.

Ya alertados por la aparición del SARS-CoV y MERS-CoV en 2002 y 2012 respectivamente, el grupo decidió adelantarse a los acontecimientos en base a sus conocimientos y experiencia, y se decidió adaptar métodos de filtración de aguas de forma que se pudiera detectar tanto virus desnudos como envueltos. El segundo artículo describe los principales cambios en la metodología de la filtración por lana de vidrio para poder detectar patógenos víricos independientemente de la naturaleza desnuda o envuelta del virión.

Durante los primeros ensayos se procedió a aplicar el método de filtración por lana de vidrio sin ninguna modificación para comprobar primeramente la recuperación final de cada virus, desnudo y envuelto, así como hasta qué punto cada paso de la concentración afectaba a las partículas virales en función de su naturaleza. Se dividió el protocolo en tres etapas principales, a saber: adsorción al filtro de lana de vidrio, elución del filtro y finalmente la concentración secundaria. Se estableció el mismo criterio de recuperación de virus que el que se utiliza en la ISO 15216 para el control de proceso, dando por válidas recuperaciones iguales o superiores al 1%.

La recuperación final de los virus modelo que utilizamos - virus de la hepatitis A como representante de virus sin envuelta y el coronavirus TGEV como modelo de virus envuelto - nos mostró que el método recuperaba suficiente virus desnudo (1.4% de recuperación de HAV), pero los virus envueltos no se recuperaban con suficiente eficiencia según el criterio establecido (0.4% de TGEV recuperado). El haber desglosado la filtración por lana de vidrio en tres pasos nos dio información de gran interés para saber qué teníamos que hacer con tal de recuperar mejor las partículas víricas que hubiera en una

muestra. Uno de los datos más relevantes fue que los virus envueltos se adhieren mucho mejor a la lana de vidrio que los virus desnudos, tanto en cantidad como en fuerza, pero también cabe destacar que durante la concentración secundaria con PEG6000 se perdía cerca de dos terceras partes del virus envuelto que se recuperaba tras la elución anterior.

La lana de vidrio es un filtro cargado positivamente en el que los virus se adhieren durante el paso de la muestra a través del mismo gracias a la carga negativa que la mayoría de ellos poseen cuando las muestras se hallan a pH neutro [262]. Posteriormente a la filtración se procede a una elución con un tampón a pH 9.5 para que los iones $-OH$ compitan con los viriones por la carga positiva del filtro. Tal y como se mencionó anteriormente, la capacidad de adhesión al filtro era mayor en TGEV que en HAV, hecho reflejado en la tabla 3 en el artículo II. Pese a ello su elución era extremadamente pobre con el método clásico, y el eluido resultante que posteriormente era reconcentrado por la floculación-precipitación de PEG 6000 contenía más virus desnudos que envueltos.

Con ese dato sobre la mesa se decidió cambiar el pH del buffer de elución de 9.5 a 11. Ese incremento en la concentración de iones $-OH$ favorecería que éstos se adhirieran a los iones H^+ del filtro de lana de vidrio, liberando así los viriones. Asimismo, para asegurar el incremento de recuperación de partículas virales se aumentó el tiempo de contacto del buffer con la lana de vidrio de 10 minutos a 1 hora. Según los detalles escritos en el protocolo de filtración por lana de vidrio antiguo, una exposición a pH 9.5 superior a 20 minutos puede comenzar a dañar las cápsides víricas, impidiendo que los patógenos recuperados pudieran ser detectados y determinados por cultivo celular. Pese a ello la mayoría de virus presentes en el tipo de muestra analizado son de per sé difícilmente cultivables y se recurre normalmente a métodos moleculares para detectarlos, con lo que el incremento de pH en el buffer de elución no suponía

un inconveniente en nuestro caso. Junto con el incremento de pH y tiempo de contacto del buffer con la lana de vidrio, se decidió que el buffer recirculara en circuito cerrado a través del filtro para favorecer la recuperación de los virus.

Una vez adaptada la filtración de aguas quedaba por mejorar la concentración secundaria. La floculación-precipitación por PEG 6000 es fácilmente mejorable dado su principio; se basa en crear mediante el PEG6000 una malla (por una combinación de iteración de agotamiento y volumen de exclusión) que, en las condiciones adecuadas – facilitadas por el buffer de elución de la filtración y por la adición de NaCl a la muestra junto al PEG 6000 – permite atrapar los viriones en ella. A mayor concentración de PEG añadido, más densa será la malla y por ende mejor captación de los virus presentes en la muestra. La concentración añadida en el método clásico es un 10% respecto al volumen total de eluido, cantidad que se decidió duplicar. De esta forma, con un 20% de PEG, la recuperación de virus en la concentración secundaria mejoró hasta un 66.6%.

La optimización del método de concentración se hizo con el objetivo de mejorar la recuperación de virus envueltos sin perjudicar la de los virus desnudos, pero el resultado final fue mejor de lo esperado; las pocas, pero las modificaciones no solo mejoraron la recuperación de TGEV, llegando a un $5.1\pm 1.4\%$, sino que también se incrementó la recuperación del HAV hasta un $4.5\pm 1.5\%$. Este método se utilizó a partir de entonces en varios tipos de muestras con varios objetivos, tal y como se detallará en el siguiente apartado.

Aplicación de la metodología optimizada para detectar patógenos de interés en muestras de agua superficial y de pozos de la zona de Riad, Arabia Saudí.

Un total de 156 muestras de aguas superficiales del área de Riad fueron concentradas mediante la filtración por lana de vidrio optimizada. Todas ellas se utilizaron tanto para poner a prueba la mejora del protocolo – reflejado en los resultados del artículo II – como para hacer un cribado de virus de interés en una región árida, contenido incluido en el primero de los tres borradores de los artículos por publicar. Nuestro grupo no se encargó de la concentración, pero sí se transfirió presencialmente el nuevo método a la investigadora principal y a otro miembro del laboratorio que llevó a cabo el muestreo y el procesamiento inicial. Dichas muestras abarcaron de diciembre de 2014 a noviembre de 2015, y en cada mes se representaron 13 puntos distintos de las aguas de Riad, 7 de las cuales fueron recogidas en diversos puntos del Wadi Hanifa (oasis Hanifa). Las muestras restantes se recolectaron de pozos circundantes. Todas las muestras fueron recogidas a principios de cada mes.

El Wadi Hanifa es de vital importancia para Riad tanto a nivel de captación de agua como de eliminación de aguas residuales. Se trata de un valle que se extiende unos 120 Km desde el noroeste al sudeste, cruzando distintas pequeñas poblaciones, y también la capital Riad.

El ambiente es seco en su extremo norte durante la mayor parte del tiempo, llenándose de agua fluvial en la época de lluvias, en la que además hay propensión a inundaciones. Durante el resto del año la mayor parte del agua queda en pozos y reservas subterráneas que se han filtrado desde el propio Wadi. La parte del sur, donde se hallan los puntos de captación de las muestras de agua, recibe un flujo constante de agua regenerada de la planta de tratamiento de aguas residuales Manfouha, así como filtraciones de los pozos. Ambas aguas se

mezclan además con la de las abundantes precipitaciones que ocurren durante la estación lluviosa (Alhamid et al., 2007).

La climatología de Arabia Saudí se puede separar en dos estaciones; la seca y la lluviosa. La estación lluviosa comienza a finales de septiembre o principios de octubre a mucho tardar, momento en el cual es frecuente que haya inundaciones. En el año 2015 se registraron tres en la estación lluviosa – una en octubre y dos en noviembre. La estación seca se caracteriza por las escasas precipitaciones en las que en la mayor parte del agua de lluvia se evapora sin recorrer el Wadi. Pese a ello pueden suceder precipitaciones también en estación seca, tal y como ocurrió en marzo de 2015.

En el segundo artículo publicado que se ha utilizado para la redacción de la tesis se aprovecharon los datos obtenidos en las aguas superficiales de los meses de septiembre a noviembre de 2015 para ver la efectividad de la optimización de la lana de vidrio en muestras naturales. Arabia Saudí es un área endémica para el HAV, con lo que no es de extrañar la presencia del virus en las aguas. De hecho, el HAV fue hallado en los tres meses de muestreo, si bien se observó una caída importante en la positividad en el mes de octubre, indicativo de que los virus acumulados en las aguas durante la estación seca se vieron afectados por las abundantes lluvias. Pese al evidente descenso de prevalencia, éste solo se vió acompañado de una caída de título en el mes de octubre.

Además del HAV, se rastreó la presencia de CoV en las muestras de agua mediante una RT-PCR semianidada que detecta una región conservada de la RdRp de *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus*. Solo una de ellas, correspondiente al mes de septiembre, dio positiva en los análisis. La amplificación fue lo suficientemente eficiente como para poder secuenciar el fragmento resultante. La secuencia hallada resultó pertenecer a un *Alphacoronavirus*, incluyéndose en un clúster de secuencias de CoV de diversos roedores como *Rattus norvegicus*, *Rattus*

rattus o *Myodes glareolus*, descubiertos en los últimos años en diversas partes del globo, entre ellos Alemania, Reino Unido y China. Pese a encontrarnos en una región donde continúa habiendo nuevos casos de MERS-CoV y tanto éste como SARS-CoV pueden excretarse en heces [263,264], no se halló ninguna secuencia de *Betacoronavirus* – género al que pertenecen tanto MERS-CoV como SARS-CoV y SARS-CoV-2 – en aguas del área de Riad.

HAV y CoV no fueron los dos únicos virus analizados en las aguas de Riad. Aparte de estos dos se analizó también la presencia de NoV y HEV. Los datos globales se han descrito en el primero de los tres borradores presentados. La presencia de HEV se determinó mediante una RT-qPCR cuya eficacia se probó para los genotipos 1 a 4 [265], pero se desconoce su capacidad de detectar los genotipos 7 y 8. Dichos genotipos son conocidos por infectar camellos, pero a día de hoy solamente HEV-7 ha mostrado tener capacidad de salto e infectar seres humanos, característica que no se ha descrito aún en HEV-8 [159,266]. Se estima una prevalencia significativa de HEV en camellos al igual que ocurre con los genotipos cuyo reservorio es el cerdo [161–164,267], pero solo dos muestras resultaron ser positivas para HEV. Ambas eran muestras de agua de pozo recogidas en mayo y noviembre, con una carga muy baja. El resto de las muestras dieron negativas, lo cual nos hace pensar que probablemente los genotipos 7 y 8 escapan a la RT-qPCR ensayada.

La presencia de HAV y NoV durante el muestreo fue mucho mayor a la de HEV. Ambos genogrupos de NoV mostraron una clara diferencia en prevalencia al comparar aguas superficiales respecto a las de pozo, cosa que no podía decirse de HAV. De hecho, en los últimos meses de la estación seca – de julio a septiembre – resultaba haber más positivos de HAV en aguas de pozo que en superficiales, llegando en algunos casos a un 100% de prevalencia. NoV resultó ser menos frecuente en aguas de pozo, encontrándose sobre todo en el período posterior a las lluvias. Es posible que se deba a que HAV sobreviva mejor

al proceso de filtración con el cual el agua de Wadi Hanifa llega a los pozos. NoV fue bastante más frecuente en aguas superficiales que HAV. NoV GII fue, de hecho, el único de los tres patógenos cuya presencia se vió menos alterada tras las inundaciones de la estación lluviosa. Tanto HAV como NoV GI vieron mermada su prevalencia en aguas superficiales y, en caso de HAV, incluso llegó a desaparecer de las aguas de pozo, probablemente por efecto de la dilución. La detección de NoV en las aguas de pozo fue casi anecdótica (con la excepción de NoV GI en febrero de 2015), con lo que no se pudo determinar ninguna dinámica en las aguas de pozo del área de Riad. Aun así, cabe resaltar el comportamiento de NoV en las aguas superficiales. Está descrito que NoV GII presenta estacionalidad, con un pico de casos en los meses fríos del año, mientras que la presencia de NoV GI es más sostenida. En las aguas del Wadi Hanifa se observó un efecto contrario. NoV GII mantuvo una prevalencia similar en todos los meses del año, con dos descensos en diciembre y julio, pero NoV GI desapareció por completo en el mes de julio, y pese a que en los meses siguientes volvió a estar presente, se detectó mucho más tras el fin de las lluvias, comenzando a decaer en los meses más cálidos y secos del año. Curiosamente, el período con mayor presencia de NoV GI – que iría aproximadamente de enero a junio – fue contrario al momento de máxima prevalencia de HAV, cuyos porcentajes de detección ascendían a sus máximos a partir de junio hasta que comenzaban las lluvias. Aunque *a priori* podría no tener sentido que el HAV y NoV se desplacen el uno al otro, hay indicios de que HAV pueda infectar también enterocitos, siendo parte importante de su ciclo infeccioso. Siendo así ambos patógenos podrían competir por los enterocitos y eso afectaría a la prevalencia, dando lugar a los picos observados.

Determinación del perfil virológico de aguas del estanque de Cal Tet, Delta del Llobregat.

Además del ambiente árido de Riad, otra de las áreas de interés para el grupo era el Delta del Llobregat. Anteriormente se había usado el método no optimizado de filtración por lana de vidrio para detectar la presencia de NoV en prácticamente toda la cuenca del río Llobregat, con la excepción de su nacimiento y del propio Delta.

El área del Delta del Llobregat es de gran interés científico. Se trata de una reserva natural que cientos de especies de aves migratorias y autóctonas utilizan para descansar, alimentarse y reproducirse. Asimismo, en el propio Delta se vierten aguas regeneradas de la depuradora del Prat del Llobregat, que recibe agua residual de cerca de la mitad del área de Barcelona. Todo ello hace que las aguas del Delta puedan contener no solamente partículas de virus clásicos como HAV, NoV y AstV, sino también patógenos emergentes que de otro modo no podrían llegar al agua, como WNV y virus Influenza, cuyo ciclo infeccioso en aves permite que puedan ser excretados de forma que contaminen el medio acuático [241,243,247,248]. En ese aspecto, uno de los puntos más relevantes es el estanque de Cal Tet, uno de los lugares de la reserva con mayor afluencia de aves. Este estanque recibe agua filtrada del propio río Llobregat junto con un input variable de agua regenerada de la depuradora en función de su nivel de agua. Obtuvimos además muestras de agua residual de la depuradora del Prat del Llobregat gracias a un proyecto que dio lugar al último apartado de la discusión. Por ello pudimos hacer una comparativa entre los dos tipos de muestra.

El perfil virológico en ambos tipos de muestra tiene claras diferencias en cuanto a la frecuencia en la que se encuentran los virus. Como cabría esperar, los

patógenos que se han detectado en ambos tipos de muestra son mucho más frecuentes en las aguas residuales que en las del estanque de Cal Tet. Pese a ello, hay dos virus que no se han hallado en aguas residuales y sí en las del Delta; el astrovirus no clásico VA4 y el linaje 2 de WNV. Solo se ha descrito la presencia de HAstV VA4 en humanos pese a la similitud con astrovirus animales [57,268,269], con lo que queda descartada la posibilidad de que haya llegado al estanque a través de las aves. Probablemente durante la depuración el HAstV VA4 fuera inactivado, pero perduró una cantidad de copias genómicas que llegaron al estanque a través del agua regenerada.

El caso de la secuencia de WNV-2 detectada es de gran relevancia. Dado que es posible hallarlo en carcasas, plumaje y tractos oral y rectal de aves infectadas [241,242] y se especula sobre una transmisión hídrica y alimentaria hacia aves [244], no es de extrañar que en lugares con una gran afluencia de estos animales se pudiera llegar a detectar en aguas tarde o temprano, a medida que la presencia de WNV fuera incrementando con el paso del tiempo. Así ocurrió en la muestra de agua de diciembre de 2017. En setiembre de ese mismo año se detectó por primera vez WNV en aves en Cataluña [270]. El ejemplar en cuestión era un azor (*Accipiter gentilis*), un ave de presa migratoria capaz de ser avistada en el Delta del Llobregat desde Europa Central, región donde WNV ya ha sido detectado en aves anteriormente, en varios ejemplares de la susodicha especie [271-274].

Hasta 2020 solo se han detectado en España unos pocos casos importados de WNV. Un mosquito del género *Culex*, vector del virus, fue introducido y se estableció en la península. Es cuestión de tiempo que aparezcan casos autóctonos de WNV en España, y de hecho el pasado verano hubo un brote en el sur de la península, cuyo foco principal se localizó en Andalucía, que se cobró 7 defunciones entre sus 76 casos. Tanto la detección del ave infectada por parte del CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal) como nuestro positivo de WNV-2

en aguas de Cal Tet fueron señales del riesgo de que WNV se establezca en Cataluña y pasemos a tener brotes y casos autóctonos cada año.

Era evidente que con ese hallazgo había que intentar secuenciar el WNV detectado, con lo que se procedió a amplificar y secuenciar la zona conservada del gen de la proteína NS5. Por desgracia no hubo forma de obtener una banda que nos permitiera genotipar nuestro virus. De los problemas de la secuenciación del fragmento de WNV hallado se puede deducir que el nivel de viriones detectados en el agua no permitió el genotipado para comparar la secuencia con otras secuencias del NS5 de WNV2 publicadas. Con la intención de poder compararla con las bases de datos, dado que la muestra dio señal en la región 3'-NCR - la región que se utiliza en la RT-qPCR - se intentó amplificarla en una PCR convencional.

Se pudo secuenciar un fragmento de la región 3'-NCR que nos confirmó la similitud de nuestra secuencia con otras de WNV2 encontrado en donantes de sangre de Europa Central, pero además una parte importante de las secuencias con mayor porcentaje de similitud con la nuestra correspondían a virus hallado en azores y otras aves de presa de la misma región, lo cual se relaciona con el hallazgo del azor infectado en setiembre con nuestra muestra de agua positiva, así como se puede considerar que el origen de la secuencia es Europa Central.

La muestra de aguas residuales recolectada en marzo de 2018 dio positiva para CoV. La secuenciación de la muestra determinó que, una vez más, detectamos un *Alphacoronavirus* de roedor, al igual que en la muestra de setiembre de 2015 de agua superficial de Riad. Sin embargo, la secuencia es claramente distinta a la mencionada. La muestra de Barcelona de marzo de 2018 posee una secuencia mucho más similar a la de CoV hallados en *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*, mientras que la secuencia de Arabia Saudí es más parecida a las encontradas en otros roedores como *Myodes glareolus*. La detección de esta

secuencia añade a Barcelona como otra localización donde se han encontrado secuencias de CoV emergentes, hasta ahora desconocidos.

Finalmente, pese a que las aguas de Cal Tet también eran candidatas para poder detectar el virus de la influenza, dada la infección sistémica que produce el virus de la gripe en aves, no se detectó la presencia del virus de la influenza en el agua. Asimismo, y aunque es posible detectarlo en heces, todas las muestras de agua residual resultaron ser negativas para el virus de la influenza.

El estudio de las aguas de Cal Tet en conjunto con las aguas residuales que entran en la depuradora cercana nos ayudan a comprender la ecología de los virus en la reserva natural del Delta del Llobregat. Los dos perfiles son distintos en prevalencia, generalmente con una clara y comprensible mayor prevalencia de patógenos en las aguas residuales, pero hay ciertas diferencias en los virus encontrados. Estos datos son de gran ayuda para discernir cuáles son más propensos a emerger a través de la migración de aves y por ende cómo controlar cada tipo de enfermedad. Además, el análisis de aguas nos ayuda a detectar fácilmente todo el perfil de virus testados, tengan el origen que tengan, siempre y cuando estén presentes en el medio acuático.

Estudio de la diversidad poblacional de EV en las aguas residuales de la zona de Barcelona mediante secuenciación masiva a partir del fragmento de la proteína VP1.

Las aguas residuales que se utilizaron para detectar los virus se recolectaron inicialmente en el marco de un proyecto de colaboración con el Departamento de Salud de la Generalitat para el cribado de EV cuyo objetivo era la detección precoz de los genotipos A71, causantes del brote de 2016 con

alrededor de un centenar de niños afectados por problemas neurológicos, algunos de ellos mostrando síndromes tan graves como romboencefalitis o parálisis flácidas, parecidas a poliomielitis [189]. También se prestó especial atención a la posible presencia del enterovirus D68 que también se ha asociado con casos de parálisis flácida.

Las muestras fueron primero analizadas mediante una RT-qPCR de EV para determinar la presencia de genomas, y las positivas fueron amplificadas mediante una RT-PCR anidada recomendada por la OMS para la secuenciación de EV. El 100% de las muestras de agua residual dieron señal positiva para EV en la qPCR, con lo que se aplicó a todas ellas la PCR de genotipado. Al comienzo se decidió llevar a cabo exclusivamente una secuenciación basada en Sanger para discernir la secuencia mayoritaria en la población de EV, pero dado que casi todas las muestras de 2017 resultaron albergar como principal genotipo el EV-B5 – anteriormente conocido como coxsackievirus B5 – se decidió complementar esa información con una secuenciación masiva. Eso también ayudó a determinar muestras que no se pudieron secuenciar por tener una población sin un genotipo claramente dominante.

Teniendo los resultados de la secuenciación masiva en nuestras manos pudimos ver diferencias importantes entre los muestreos de 2017 y 2018. El año 2017 se caracterizó por mostrar las muestras una baja diversidad de población de EV, la mayor parte con solo 6 o menos genotipos detectados. La única excepción fue la muestra de noviembre, con 8 genotipos. Las muestras pertenecientes al año 2018 poseían una mayor diversidad de EV, y solo la de enero presentó menos de 6 genotipos. En la muestra de agosto de 2018 llegaron a detectarse hasta 18 genotipos distintos.

En ambos años se puede constatar que en los meses de agosto a noviembre se ve un incremento de complejidad en la población de EV, si bien es

mucho mayor y menos escalonado en 2018, con un nuevo descenso a partir de diciembre. En el año 2018 también se detectó un pico de diversidad poblacional en abril, pero desgraciadamente el proyecto comenzó en mayo de 2017, y no tenemos muestra de dicho año para comparar. Cabe recordar las intensas precipitaciones que cayeron durante todo octubre de 2017, un factor que podría haber diluido los genotipos de EV que llegaron a la depuradora. Es posible que debido a la dilución por las precipitaciones muchos genotipos no pudieran ser detectados ni tan siquiera a través de la secuenciación masiva y podría explicar la caída de diversidad en noviembre, pues la muestra de noviembre recogería esa dilución por las precipitaciones, mientras que la de diciembre captó de nuevo los virus que circulaban mayormente por el agua por el descenso de la pluviosidad. El año 2018 fue significativamente más seco que 2017, con lo que ese efecto de dilución por las lluvias no se observó. En cambio, pudimos ver el gran incremento de genotipos de EV en el mes de agosto respecto a los demás meses del año, posible consecuencia de la llegada de turismo a la ciudad. Con la entrada del turismo pueden aparecer genotipos importados de EV que no son habituales en la región, reflejándose en las aguas residuales de la ciudad. Con la llegada del otoño y la caída del turismo, la diversidad de genotipos de EV en aguas residuales volvió a decaer.

En los últimos años, la clasificación del género Enterovirus ha cambiado dramáticamente. Unos de los cambios más drásticos ha sido la anexión dentro del género Enterovirus del extinto género *Rhinovirus* cuyos miembros son actualmente especies dentro de Enterovirus, como también lo son actualmente los distintos coxsakievirus o echovirus. En cuanto a las secuencias encontradas, hay una clara mayoría de serotipos englobados en Enterovirus B. Muchos de los serotipos mayoritarios que no eran EV-B5 constituían los genotipos anteriormente englobados bajo el nombre echovirus, y que a día de hoy forman parte de Enterovirus B. La única muestra cuya secuencia mayoritaria no fue un

Enterovirus B es la de diciembre de 2018, en la que predominó EV-A16 - anteriormente coxsackievirus A16. Enterovirus C queda en casi todas las muestras con una presencia anecdótica, con menos de un 3% de presencia, a excepción de, una vez más, la muestra de diciembre de 2018. Excluyendo la susodicha, en todas los demás, Enterovirus B fue claramente la especie predominante en el área de Barcelona, llegando a representar en ciertos meses más del 95% de las secuencias detectadas. Incluso en agosto, mes donde se detecta la mayor variedad de EV, y muchos de ellos pertenecen a las especies Enterovirus A y Enterovirus C sigue representando más del a mitad de la población de virus presentes.

El último punto para resaltar es el cambio de EV-B5 como secuencia mayoritaria a partir de diciembre de 2017. En ese mes desaparece de la población y pasa a ser sustituida por diversos echovirus, y si bien reaparece algunos meses, solo en setiembre de 2018 vuelve a ser mayoritaria. Teniendo en cuenta que fue en diciembre cuando hubo el cambio de EV-B5 a echovirus, es posible que el cambio en la secuencia mayoritaria de diciembre de 2018 a EV-A16 forme parte de un ciclo de cambio de genotipos predominantes, pero por los datos que tenemos no podemos confirmarlo con seguridad.

Pese a que el artículo habla de los análisis realizados desde mayo de 2017 hasta diciembre de 2018, el estudio continúa a día de hoy. Gracias a ello se pudo detectar por primera y única vez desde el brote de 2016 una muestra positiva para EV-A71. Dicha muestra de agua residual corresponde a la recogida en junio de 2020, cuando todavía seguía en vigor el estado de alarma declarado por la pandemia de covid-19. El caso de esta muestra es particularmente interesante ya que no solamente contenía genomas de EV-A71, sino que además las secuencias de EV-A71 eran las mayoritarias en la muestra, con una frecuencia del 72.94%, y era el único serotipo de enterovirus. El 27.06% de secuencias restantes no pudieron ser identificadas como ningún EV en la base de datos de Blast.

6 - CONCLUSIONES

- El método de filtración por lana de vidrio ha mejorado sustancialmente sus prestaciones tras la optimización sin comprometer sus principales puntos a favor; robustez y bajo coste económico.
- La utilidad del método optimizado ha sido claramente demostrada tras haber analizado muestras naturales con una alta carga orgánica al haber sido utilizada para procesar muestras varios tipos de muestras, como aguas fluviales y pozos subterráneos alimentados por filtración de Arabia Saudí, así como aguas de estanques salobres.
- Las tasas de positividad de las muestras para virus envueltos han sido relativamente bajas. Con todo, gracias a la capacidad de concentrar eficientemente virus envueltos se ha podido detectar en más de una muestra virus emergentes como el virus del Nilo Occidental en el Delta del Llobregat o un nuevo *Alphacoronavirus* de roedores tanto en aguas residuales de Barcelona como de Arabia Saudí.
- Los virus entéricos desnudos clásicos han podido ser detectados con unas frecuencias dentro de lo esperable en muestras como las de aguas residuales, lo cual nos permite confirmar que el método optimizado de precipitación con PEG no perjudica la recuperación de virus de cápside desnuda.
- Únicamente se ha podido determinar un brote de transmisión alimentaria durante el transcurso de la tesis. Sin embargo, al tratarse del primer brote de gastroenteritis asociada a agua embotellada, se ha puesto de manifiesto el interés del control de este tipo de productos para evitar casos similares en el futuro.

- Tras el brote declarado en abril de 2016, afectando a la población infantil, no hubo más rastro de enterovirus A71 o D68, pero el seguimiento ha permitido poder establecer patrones y tendencias en la población de EV relacionadas no solo con factores ambientales sino también con variables demográficas como es el caso de los viajes turísticos.
- La disponibilidad de agua y las propiedades del terreno circundante provocan cambios en el comportamiento de los virus cuando hay precipitaciones importantes o inundaciones. En zonas áridas sucede un efecto de dilución, mientras que en aguas residuales hemos podido comprobar un aumento de la población de virus tras diluvios debido a la mezcla del agua con los lodos que contienen virus adheridos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bond T, Roma E, Foxon KM, Templeton MR, Buckley CA. *Ancient water and sanitation systems-applicability for the contemporary urban developing world*. Water Sci Technol. 2013;67(5):935–41.
- [2] Borkow G, Gabbay J. *Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections*. Curr Chem Biol. 2009;3(3):272–8.
- [3] Ashbolt NJ. *Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions*. Toxicology. 2004;198(1–3):229–38.
- [4] Angelakis AN, Koutsoyiannis D, Tchobanoglous G. *Urban wastewater and stormwater technologies in ancient Greece*. Water Res. 2005;39(1):210–20.
- [5] WHO 2017. *JMP launch version July 12 2017. Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene - 2017 Update and SDG Baselines*. WHO Libr Cat Data. 2017;
- [6] Bosch A, Pintó RM, Guix S. *Foodborne viruses*. Curr Opin Food Sci. 2016;8:110–9.
- [7] Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA. *Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters*. Appl Environ Microbiol. 2008;74(10):2990–6.
- [8] Kiulia NM, Netshikweta R, Page NA, Van Zyl WB, Kiraithe MM, Nyachio A, et al. *The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses*. J Appl Microbiol. 2010 Sep;109(3):818–28.
- [9] Gantzer C, Senouci S, Maul A, Levi Y, Schwartzbrod L. *Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR*. J Virol Methods. 1997 May;65(2):265–71.
- [10] Sano D, Pérez-Sautu U, Guix S, Pintó RM, Miura T, Okabe S, et al. *Quantification and Genotyping of Human Sapoviruses in the Llobregat River Catchment, Spain*. Appl Environ Microbiol. 2011 Feb 1;77(3):1111–4.
- [11] Pérez-Sautu U, Sano D, Guix S, Kasimir G, Pintó RM, Bosch A. *Human*

- norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain.* Environ Microbiol. 2012 Feb;14(2):494–502.
- [12] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. *Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis.* Lancet Infect Dis. 2014 Aug;14(8):725–30.
- [13] Turnage NL, Gibson KE. *Sampling methods for recovery of human enteric viruses from environmental surfaces.* J Virol Methods. 2017 Oct;248:31–8.
- [14] *Viral Agents of Gastroenteritis Public Health Importance and Outbreak Management* [Internet]. [cited 2019 Jan 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001625.htm>
- [15] Graves NS. *Acute Gastroenteritis.* Prim Care Clin Off Pract. 2013 Sep;40(3):727–41.
- [16] *Norovirus | Norovirus Worldwide | CDC* [Internet]. [cited 2019 Jan 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/worldwide.html>
- [17] European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] & European Food Safety Authority [EFSA]. *The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.* EFSA J. 2018;12(2):1–312.
- [18] Adler JL, Zickl R. *Winter vomiting disease.* J Infect Dis. 1969 Jun;119(6):668–73.
- [19] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. *Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis.* J Virol. 1972 Nov;10(5):1075–81.
- [20] Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. *Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus.* Virology. 1993 Jul 1;195(1):51–61.
- [21] Thorne LG, Goodfellow IG. *Norovirus gene expression and replication.* J Gen

- Viol. 2014;95(Pt_2):278–91.
- [22] Sarvestani ST, Cotton B, Fritzlar S, O'Donnell TB, Mackenzie JM. *Norovirus Infection: Replication, Manipulation of Host, and Interaction with the Host Immune Response*. J Interf Cytokine Res. 2016;36(4):215–25.
- [23] Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. *Norovirus*. Clin Microbiol Rev. 2015;28(1):134–64.
- [24] Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MPG, Estes MK. *Laboratory efforts to cultivate noroviruses*. J Gen Virol. 2004;85(1):79–87.
- [25] Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. *Taxonomy of the Caliciviruses*. J Infect Dis. 2000;181(s2):S322–30.
- [26] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Tenge VR, Neill FH, et al. *Replication of Human Noroviruses in Stem Cell-Derived Human Enteroids*. Science (80-). 2016;353(6306):1387–93.
- [27] Moyo K, Porter C, Chilima B, Mwenda R, Kabue M, Zungu L, et al. *Norovirus Cell Tropism is Determined by Combinatorial Action of a Viral Non-structural Protein and Host Cytokine*. Cell Host Microbe. 2016;4(1):1–19.
- [28] Orchard RC, Wilen CB, Doench JG, Baldrige MT, McCune BT, Lee Y-CJ, et al. *Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus*. Science. 2016;353(6302):933–6.
- [29] Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan YH, Murakami K, et al. *Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells*. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(41):E6248–55.
- [30] Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, et al. *Norovirus and Histo-Blood Group Antigens: Demonstration of a Wide Spectrum of Strain Specificities and Classification of Two Major Binding Groups among Multiple Binding Patterns*. J Virol. 2005;79(11):6714–22.
- [31] Wegener H, Mallagaray Á, Schöne T, Peters T, Lockhauserbäumer J, Yan H, et al. *Human norovirus GII.4(MI001) P dimer binds fucosylated and*

- sialylated carbohydrates*. *Glycobiology*. 2017;27(11):1027–37.
- [32] De Graaf M, Van Beek J, Koopmans MPG. *Human norovirus transmission and evolution in a changing world*. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(7):421–33.
- [33] Belov GA, van Kuppeveld FJ. (+)RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Curr Opin Virol*. 2012 Dec;2(6):740–7.
- [34] Yen J-B, Wei L-H, Chen L-W, Chen L-Y, Hung C-H, Wang S-S, et al. *Subcellular Localization and Functional Characterization of GII.4 Norovirus-Encoded NTPase*. *J Virol*. 2018;92(5):1824–41.
- [35] Rohayem J, Robel I, Jäger K, Scheffler U, Rudolph W. *Protein-Primed and De Novo Initiation of RNA Synthesis by Norovirus 3D pol*. *J Virol*. 2006;80(14):7060–9.
- [36] Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG. *Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses*. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(8):2530–46.
- [37] Morales M, Bárcena J, Ramírez MA, Boga JA, Parra F, Torres JM. *Synthesis in Vitro of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Subgenomic RNA by Internal Initiation on (-)Sense Genomic RNA*. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):17013–8.
- [38] White PA. *Evolution of norovirus*. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(8):741–5.
- [39] Kitajima M, Rachmadi AT, Iker BC, Haramoto E, Gerba CP. *Genetically distinct genogroup IV norovirus strains identified in wastewater*. *Arch Virol*. 2016;161(12):3521–5.
- [40] Vinjé J. *Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(2):373–81.
- [41] Giammanco GM, De Grazia S, Bonura F, Cappa V, Muli SL, Pepe A, et al. *Norovirus GII.17 as Major Epidemic Strain in Italy, Winter 2015–16*. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jul;23(7):1206–8.
- [42] Lindesmith LC, Kocher JF, Donaldson EF, Debbink K, Mallory ML,

- Swann EW, et al. *Emergence of Novel Human Norovirus GII.17 Strains Correlates With Changes in Blockade Antibody Epitopes*. J Infect Dis. 2017 Dec 5;216(10):1227–34.
- [43] Silva LD da, Bandeira R da S, Junior ECS, Lima ICG de, da Penha Júnior ET, Teixeira DM, et al. *Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil*. Infect Genet Evol. 2017 Mar;48:1–3.
- [44] Lysén M, Thorhagen M, Brytting M, Hjertqvist M, Andersson Y, Hedlund KO. *Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden*. J Clin Microbiol. 2009;47(8):2411–8.
- [45] Ayukekbong JA, Andersson ME, Vansarla G, Tah F, Nkuo-Akenji T, Lindh M, et al. *Monitoring of seasonality of norovirus and other enteric viruses in Cameroon by real-time PCR: An exploratory study*. Epidemiol Infect. 2014;142(7):1393–402.
- [46] Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. *Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses*. J Infect Dis. 2000;181(s2):S284–7.
- [47] Götz H, Ekdahl K, Lindbäck J, de Jong B, Hedlund KO, Giesecke J. *Clinical Spectrum and Transmission Characteristics of Infection with Norwalk-Like Virus: Findings from a Large Community Outbreak in Sweden*. Clin Infect Dis. 2001;33(5):622–8.
- [48] Lee RM, Lessler J, Lee RA, Rudolph KE, Reich NG, Perl TM, et al. *Incubation periods of viral gastroenteritis: A systematic review*. BMC Infect Dis. 2013;13(1):1.
- [49] Devasia T, Lopman B, Leon J, Handel A. *Association of host, agent and environment characteristics and the duration of incubation and symptomatic periods of norovirus gastroenteritis*. Epidemiol Infect. 2015;143(11):2308–14.
- [50] Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, et al. *Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal*

- complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation.* Blood. 2011;117(22):5850–6.
- [51] Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DWG. *Clinical Manifestation of Norovirus Gastroenteritis in Health Care Settings.* Clin Infect Dis. 2004;39(3):318–24.
- [52] García C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko GP. *Asymptomatic norovirus infection in Mexican children.* J Clin Microbiol. 2006;44(8):2997–3000.
- [53] Huynen P, Mauroy A, Martin C, Savadogo LGB, Boreux R, Thiry E, et al. *Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso.* J Clin Virol. 2013;58(3):515–21.
- [54] Madeley CR, Cosgrove BP. *Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis.* Lancet (London, England). 1975 Sep 6;2(7932):451–2.
- [55] Ernesto Méndez, Andrea Murillo RV, Andrew Burnham CFA. *Replication Cycle of Astroviruses.* In: Schultz-Cherry S, editor. *Astrovirus Research.* New York, NY: Springer New York; 2013. p. 19–46.
- [56] Cortez V, Meliopoulos VA, Karlsson EA, Hargest V, Johnson C, Schultz-Cherry S. *Astrovirus Biology and Pathogenesis.* Annu Rev Virol. 2017;4(1):327–48.
- [57] Bosch A, Pintó RM, Guix S. *Human astroviruses.* Clin Microbiol Rev. 2014;27(4):1048–74.
- [58] Brinker JP, Blacklow NR, Herrmann JE. *Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines.* Arch Virol. 2000;145(9):1847–56.
- [59] Méndez E, Muñoz-Yañez C, Sánchez-San Martín C, Aguirre-Crespo G, Baños-Lara M del R, Gutierrez M, et al. *Characterization of human astrovirus cell entry.* J Virol. 2014 Mar;88(5):2452–60.
- [60] Fuentes C, Bosch A, Pintó RM, Guix S. *Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity.* J Virol. 2012 Sep

- 15;86(18):10070–8.
- [61] Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM. *C-Terminal nsP1a Protein of Human Astrovirus Colocalizes with the Endoplasmic Reticulum and Viral RNA*. J Virol. 2004;78(24):13627–36.
- [62] Fuentes C, Guix S, Bosch A, Pinto RM. *The C-Terminal nsP1a Protein of Human Astrovirus Is a Phosphoprotein That Interacts with the Viral Polymerase*. J Virol. 2011 May 1;85(9):4470–9.
- [63] Jiang B, Monroe SS, Koonint E V, Stine SE, Glass RI. *RNA sequence of astrovirus: Distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis*. Vol. 90, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993.
- [64] Kiang D, Matsui SM. *Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein*. J Gen Virol. 2002;83:25–34.
- [65] Krishna NK. *Identification of Structural Domains Involved in Astrovirus Capsid Biology*. Viral Immunol. 2005;18(1):17–26.
- [66] Guix S, Bosch A, Ribes E, Martínez LD, Pintó RM. *Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells*. Virology. 2004 Feb 20;319(2):249–61.
- [67] Arias CF, Dubois RM. *The Astrovirus Capsid: A Review*. Viruses. 2017;9(1):15.
- [68] Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, et al. *Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses*. Virol J. 2009;6(October).
- [69] Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Logan L, et al. *Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants*. J Infect Dis. 1998 Aug;178(2):334–9.
- [70] Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, et al. *Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain*. J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):133–9.
- [71] Blacklow, Neil R; Herrmann JE. *Astrovirus Gastroenteritis*. Trans Am Clin

- Clim Assoc. 1995;106:58–68.
- [72] Vu D-L, Bosch A, Pintó RM, Guix S. *Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond*. *Viruses*. 2017;9(2):33.
- [73] Aminu M, Ameh EA, Geyer A, Esona MD, Taylor MB, Steele AD. *Role of Astrovirus in Intussusception in Nigerian infants*. *J Trop Pediatr*. 2009;55:192–4.
- [74] Johnson C, Hargest V, Cortez V, Meliopoulos VA, Schultz-Cherry S. *Astrovirus Pathogenesis*. *Viruses*. 2017;9(1).
- [75] Lum SH, Turner A, Guiver M, Bonney D, Martland T, Davies E, et al. *An emerging opportunistic infection: fatal astrovirus (VA1/HMO-C) encephalitis in a pediatric stem cell transplant recipient*. *Transpl Infect Dis*. 2016;18(6):960–4.
- [76] Holtz LR, Wylie KM, Sodergren E, Jiang Y, Franz CJ, Weinstock GM, et al. *Astrovirus MLB2 viremia in febrile child*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(11):2050–2.
- [77] Naccache SN, Peggs KS, Mattes FM, Phadke R, Garson JA, Grant P, et al. *Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing*. *Clin Infect Dis*. 2015;60(6):919–23.
- [78] Cordey S, Vu D-L, Schibler M, L’Huillier AG, Brito F, Docquier M, et al. *Astrovirus MLB2, a New Gastroenteric Virus Associated with Meningitis and Disseminated Infection*. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(5):846–53.
- [79] Holtz LR, Bauer IK, Rajendran P, Kang G, Wang D. *Astrovirus MLB1 Is Not Associated with Diarrhea in a Cohort of Indian Children*. Poon LLM, editor. *PLoS One*. 2011 Dec;6(12).
- [80] Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al. *A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes*. *Nature*. 2013;496(7445):367–71.
- [81] Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai,

- et al. *Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation*. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1112–25.
- [82] Cockayne EA. *Catharral jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver*. QJM. 1912 Oct 1;6(1):1–29.
- [83] Feinstone SM. *History of the Discovery of Hepatitis A Virus*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Apr 30;a031740.
- [84] Stuart DI, Ren J, Wang X, Rao Z, Fry EE. *Hepatitis A Virus Capsid Structure*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8.
- [85] Sadahiro A, Fukao A, Kosaka M, Funakami Y, Takizawa N, Takeuchi O, et al. *Translation of Hepatitis A Virus IRES Is Upregulated by a Hepatic Cell-Specific Factor*. Front Genet. 2018;9:307.
- [86] Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. *Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention*. Vol. 68, Journal of Hepatology. Elsevier B.V.; 2018. p. 167–84.
- [87] Siegl G. *Replication of hepatitis A virus and processing of proteins*. Vaccine. 1992;10:S32–5.
- [88] Bishop NE, Anderson DA. *Uncoating Kinetics of Hepatitis A Virus Virions and Provirions*. J Virol. 2000;74(7):3423–6.
- [89] Pintó RM, Pérez-Rodríguez F-J, D'Andrea L, de Castellarnau M, Guix S, Bosch A. *Hepatitis A Virus Codon Usage: Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(10):a031781.
- [90] Leong LE-C, Cornell CT, Semler BL. *Processing Determinants and Functions of Cleavage Products of Picornavirus Polyproteins*. In: Molecular Biology of Picornavirus. American Society of Microbiology; 2002. p. 187–97.
- [91] Sánchez G, Bosch A, Pintó RM. *Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis a virus*. J Virol. 2003;77(1):452–9.

- [92] Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. *Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus*. EMBO J. 1996;15(16):4282–96.
- [93] Wang J, Qiao L, Hou Z, Luo G. *TIM-1 Promotes Hepatitis C Virus Cell Attachment and Infection*. Ou J-HJ, editor. J Virol. 2017;91(2).
- [94] Niu J, Jiang Y, Xu H, Zhao C, Zhou G, Chen P, et al. *TIM-1 Promotes Japanese Encephalitis Virus Entry and Infection*. Viruses. 2018;10(11).
- [95] Das A, Hirai-Yuki A, González-López O, Rhein B, Moller-Tank S, Brouillette R, et al. *TIM1 (HAVCR1) Is Not Essential for Cellular Entry of Either Quasi-enveloped or Naked Hepatitis A Virions*. Meng X-J, editor. MBio. 2017;8(5).
- [96] Costafreda MI, Kaplan G. *HAVCR1 (CD365) and Its Mouse Ortholog Are Functional Hepatitis A Virus (HAV) Cellular Receptors That Mediate HAV Infection*. J Virol. 2018;92(9):e02065-17.
- [97] Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. *The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor*. J Virol. 1998;72(8):6621–8.
- [98] Shukla A, Padhi AK, Gomes J, Banerjee M. *The VP4 Peptide of Hepatitis A Virus Ruptures Membranes through Formation of Discrete Pores*. J Virol. 2014;88(21):12409–21.
- [99] Brown EA, Day SP, Jansen RW, Lemon SM. *The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro*. J Virol. 1991 Nov;65(11):5828–38.
- [100] Tesar M, Harmon SA, Summers DF, Ehrenfeld E. *Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons*. Virology. 1992;186(2):609–18.
- [101] Teterina NL, Bienz K, Egger D, Gorbalenya AE, Ehrenfeld E. *Induction of Intracellular Membrane Rearrangements by HAV Proteins 2C and 2BC*. Virology. 1997;237(1):66–77.

- [102] Jiang P, Liu Y, Ma H-C, Paul A V., Wimmer E. *Picornavirus Morphogenesis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3):418–37.
- [103] Feng Z, Lemon SM. *Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis*. *Trends Microbiol*. 2014;22(2):59–64.
- [104] McKnight KL, Lemon SM. *Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(12).
- [105] Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, et al. *Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein*. *J Virol*. 2002;76(18):9516–25.
- [106] Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferré V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. *Genetic variability of hepatitis A virus*. *J Gen Virol*. 2003;84(12):3191–201.
- [107] Stapleton JT, Lemon SM. *Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus*. *J Virol*. 1987;61(2):491–8.
- [108] Nainan O V, Brinton MA, Margolis HS. *Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus*. *Virology*. 1992;191(2):984–7.
- [109] Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, et al. *Hepatitis a virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(4):734–7.
- [110] Aragonès L, Bosch A, Pintó RM. *Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability*. *J Virol*. 2008;82(4):1688–700.
- [111] Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, Xia G, et al. *Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution*. *Infect Genet Evol*. 2014;21:227–43.
- [112] Smith DB, Simmonds P. *Classification and Genomic Diversity of Enterically Transmitted Hepatitis Viruses*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(9).

- [113] Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan O V., Siegl G, et al. *Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions*. J Gen Virol. 1992;73(6):1365–77.
- [114] Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, Sala R, Barrabeig I, Bosch A, et al. *Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: Circulation of newly emerging strains*. J Clin Virol. 2011 Oct;52(2):98–102.
- [115] Barde P V, Shukla MK, Pathak R, Kori BK, Bharti PK. *Circulation of hepatitis A genotype IIIA virus in paediatric patients in central India*. Indian J Med Res. 2014;139(6):940–4.
- [116] KUMBANG J, EJIDE S, TEDDER RS, NGUI SL. *Outbreak of hepatitis A in an extended family after importation by non-immune travellers*. Epidemiol Infect. 2012 Oct;140(10):1813–20.
- [117] D'Andrea L, Pérez-Rodríguez F, de Castellarnau M, Manzanares S, Lite J, Guix S, et al. *Hepatitis A Virus Genotype Distribution during a Decade of Universal Vaccination of Preadolescents*. Int J Mol Sci. 2015;16(12):6842–54.
- [118] WHO. *Hepatitis A* [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 22]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>
- [119] CDC. *Vaccine Information Statement | Hepatitis A | VIS | CDC* [Internet]. [cited 2019 Apr 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/hep-a.html>
- [120] CDC, Ncird. *Immunology and Vaccine-Preventable Diseases – Pink Book - Hepatitis A*.
- [121] Jeong S-H, Lee H-S. *Hepatitis A: Clinical Manifestations and Management*. Intervirology. 2010;53(1):15–9.
- [122] Iorio N, John S. *Hepatitis A*. StatPearls. StatPearls Publishing; 2018.
- [123] Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigou M, Nicand E, Ferre V, et al. *Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis*

- A infection*. Hepatology. 2003;38(3):613–8.
- [124] WHO | *Hepatitis A* [Internet]. WHO. World Health Organization; 2014 [cited 2019 Feb 25]. Available from: <https://www.who.int/ith/vaccines/hepatitisA/en/>
- [125] *Twinrix: A combination hepatitis A and B vaccine*. Med Lett Drugs Ther. 2001 Aug;43(1110):67–8.
- [126] Stoffel M, Lievens M, Dieussaert I, Martin I, André F. *Immunogenicity of Twinrix™ in older adults: a critical analysis*. Expert Rev Vaccines. 2003;2(1):9–14.
- [127] Beran J, Chlibek R, Weber F. *A combined dual-chamber typhoid/hepatitis A vaccine as a booster dose in hepatitis A primed adults*. Vaccine. 2003;21(32):4650–4.
- [128] Stuurman AL, Marano C, Bunge EM, De Moerlooze L, Shouval D. *Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines – A systematic review*. Hum Vaccin Immunother. 2017;13(3):724–36.
- [129] WHO | *Live attenuated hepatitis A vaccine* [Internet]. WHO. World Health Organization; 2015 [cited 2019 Feb 25]. Available from: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/hepatitisa/Jun_2010/en/
- [130] Khuroo MS. *Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type*. Am J Med. 1980;68(6):818–24.
- [131] Purcell RH, Emerson SU. *Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease*. J Hepatol. 2008;48(3):494–503.
- [132] Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. *Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure*. World J Gastroenterol. 2016 Aug 21;22(31):7030–45.
- [133] Khuroo MS, Khuroo MS. *Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure*. J Viral Hepat. 2016;23(2):68–79.
- [134] Xing L, Kato K, Li T, Takeda N, Miyamura T, Hammar L, et al.

- Recombinant Hepatitis E Capsid Protein Self-Assembles into a Dual-Domain T = 1 Particle Presenting Native Virus Epitopes.* *Virology.* 1999;265(1):35–45.
- [135] Kenney SP, Meng X-J. *Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy.* *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(1).
- [136] Wang Y, Zhao C, Qi Y, Geng Y. *Hepatitis E Virus.* In: *Advances in experimental medicine and biology.* 2016. p. 1–16.
- [137] Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, et al. *Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus.* Meng X-J, editor. *PLOS Pathog.* 2016;12(4).
- [138] Cao D, Huang Y-W, Meng X-J. *The nucleotides on the stem-loop RNA structure in the junction region of the hepatitis E virus genome are critical for virus replication.* *J Virol.* 2010;84(24):13040–4.
- [139] Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. *A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus.* *J Virol.* 2006;80(12):5919–26.
- [140] Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. *Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection.* *J Virol.* 2009 Dec;83(24):12714–24.
- [141] Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. *Hepatitis E virus: advances and challenges.* *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(2):96–110.
- [142] He S, Miao J, Zheng Z, Wu T, Xie M, Tang M, et al. *Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus.* *J Gen Virol.* 2008;89(1):245–9.
- [143] Guu TSY, Liu Z, Ye Q, Mata DA, Li K, Yin C, et al. *Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(31):12992–7.
- [144] Himmelsbach K, Bender D, Hildt E. *Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus.* *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):1–12.
- [145] Koonin E V, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR,

- Bradley DW. *Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(17):8259–63.
- [146] Kang S, Choi C, Choi I, Han K-N, Rho SW, Choi J, et al. *Hepatitis E Virus Methyltransferase Inhibits Type I Interferon Induction by Targeting RIG-I*. J Microbiol Biotechnol. 2018;28(9):1554–62.
- [147] Nan Y, Yu Y, Ma Z, Khattar SK, Fredericksen B, Zhang Y-J. *Hepatitis E Virus Inhibits Type I Interferon Induction by ORF1 Products*. J Virol. 2014;88(20):11924–32.
- [148] Parvez MK. *Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 'Y-domain': Effects on RNA replication and virion infectivity*. World J Gastroenterol. 2017;23(4):590.
- [149] Parvez MK. *The hepatitis E virus ORF1 'X-domain' residues form a putative macrodomain protein/APP-1"-pase catalytic-site, critical for viral RNA replication*. Gene. 2015;566(1):47–53.
- [150] Ding Q, Heller B, Capuccino JM V., Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, et al. *Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles*. Proc Natl Acad Sci. 2017;114(5):1147–52.
- [151] Kapur N, Thakral D, Durgapal H, Panda SK. *Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis*. J Viral Hepat. 2012;19(6):436–48.
- [152] Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. *Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses*. J Virol. 2016;90(8):4232–42.
- [153] Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. *A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (Oncorhynchus clarkii)*. Virus Res. 2011;158(1–2):116–23.
- [154] Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ.

- Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States.* J Gen Virol. 2001;82(Pt 10):2449–62.
- [155] Reuter G, Boros Á, Mátics R, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. *A novel avian-like hepatitis E virus in wild aquatic bird, little egret (Egretta garzetta), in Hungary.* Infect Genet Evol. 2016;46:74–7.
- [156] Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group members of the IC on the T of VHS, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. *Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae.* J Gen Virol. 2014 Oct;95(10):2223–32.
- [157] Wang B, Li W, Zhou J-H, Li B, Zhang W, Yang W-H, et al. *Chevrier's Field Mouse (Apodemus chevrieri) and Père David's Vole (Eothenomys melanogaster) in China Carry Orthohepeviruses that form Two Putative Novel Genotypes Within the Species Orthohepevirus C.* Virol Sin. 2018;33(1):44–58.
- [158] Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tsang AKL, Joseph M, Wong EYM, et al. *New Hepatitis E Virus Genotype in Camels, the Middle East.* Emerg Infect Dis. 2014;20(6):1044–8.
- [159] Sander A-L, Corman VM, Lukashev AN, Drexler JF. *Evolutionary Origins of Enteric Hepatitis Viruses.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(12).
- [160] Widén F. *Hepatitis E as a Zoonosis.* In: Advances in experimental medicine and biology. 2016. p. 61–71.
- [161] Haider N, Khan MSU, Hossain MB, Sazzad HMS, Rahman MZ, Ahmed F, et al. *Serological evidence of hepatitis E virus infection in pigs and jaundice among pig handlers in Bangladesh.* Zoonoses Public Health. 2017;64(7):572–7.
- [162] Zhang L, Li K, Huang S, Liu D, Rehman MU, Lan Y, et al. *Seroprevalence and risk factors associated with hepatitis E virus infections among people and pigs in Tibet, China.* Acta Trop. 2017;172:102–6.
- [163] García-Hernández ME, Cruz-Rivera M, Sánchez-Betancourt JI, Rico-

- Chávez O, Vergara-Castañeda A, Trujillo ME, et al. *Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico*. BMC Vet Res. 2017;13(1):289.
- [164] Merino-Ramos T, Martín-Acebes MA, Casal J, Saiz J-C, Loza-Rubio E. *Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Mexican Pigs*. Food Environ Virol. 2016;8(2):156-9.
- [165] Thiry D, Rose N, Mauroy A, Paboeuf F, Dams L, Roels S, et al. *Susceptibility of Pigs to Zoonotic Hepatitis E Virus Genotype 3 Isolated from a Wild Boar*. Transbound Emerg Dis. 2017;64(5):1589-97.
- [166] WHO. *Hepatitis E* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 4]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
- [167] Alvarado-Esquivel C, Sanchez-Anguiano LF, Hernandez-Tinoco J. *Seroepidemiology of hepatitis e virus infection in mennonites in Mexico*. J Clin Med Res. 2015;7(2):103-8.
- [168] Arankalle VA, Tsarev SA, Chadha MS, Alling DW, Emerson SU, Banerjee K, et al. *Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992*. J Infect Dis. 1995;171(2):447-50.
- [169] Labrique AB, Zaman K, Hossain Z, Saha P, Yunus M, Hossain A, et al. *Epidemiology and Risk Factors of Incident Hepatitis E Virus Infections in Rural Bangladesh*. Am J Epidemiol. 2010;172(8):952-61.
- [170] Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. *Hepatitis E*. N Engl J Med. 2012;367(13):1237-44.
- [171] Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP, Thapa GB, Thapa N, et al. *Safety and Efficacy of a Recombinant Hepatitis E Vaccine*. N Engl J Med. 2007;356(9):895-903.
- [172] Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. *The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005*. Hepatology. 2012;55(4):988-97.
- [173] Aggarwal R. *Clinical presentation of hepatitis E*. Virus Res. 2011;161(1):15-

- 22.
- [174] Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. *Hepatitis E Virus Infection*. Clin Microbiol Rev. 2014;27(1):116–38.
- [175] Pavio N, Mansuy J-M. *Hepatitis E in high-income countries*. Curr Opin Infect Dis. 2010;23(5):521–7.
- [176] Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S. *Mystery of Hepatitis E Virus: Recent Advances in Its Diagnosis and Management*. Int J Hepatol. 2015;2015:1–6.
- [177] Geng Y, Zhang H, Huang W, J Harrison T, Geng K, Li Z, et al. *Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia*. Hepat Mon. 2014;14(1).
- [178] Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. *Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis*. Liver Int. 2008;28(9):1190–9.
- [179] Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, et al. *Hepatitis E virus infection*. Nat Rev Dis Prim. 2017;16(3):17086.
- [180] Dalton HR, Kamar N, van Eijk JJJ, Mclean BN, Cintas P, Bendall RP, et al. *Hepatitis E virus and neurological injury*. Nat Rev Neurol. 2016 Feb;12(2):77–85.
- [181] Mclean BN, Gulliver J, Dalton HR. *Hepatitis E virus and neurological disorders*. Pract Neurol. 2017;17(4):282–8.
- [182] Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, Van der Eijk AA. *Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? J Hepatol*. 2017;66(5):1082–95.
- [183] Kamar N, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Dalton HR. *Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus*. Liver Int. 2016;36(4):467–72.
- [184] Nikonov OS, Chernykh ES, Garber MB, Nikonova EY. *Enteroviruses: Classification, diseases they cause, and approaches to development of antiviral drugs*. Biochem. 2017;82(13):1615–31.
- [185] Martínez-Salas E, Francisco-Velilla R, Fernandez-Chamorro J, Lozano G, Diaz-Toledano R. *Picornavirus IRES elements: RNA structure and host*

- protein interactions*. *Virus Res*. 2015;206:62–73.
- [186] Ao Y-Y, Yu J-M, Zhang C-Y, Xin Y-Y, Li L-L, Duan Z-J. *Identification of a Novel Enterovirus Species in Rhesus Macaque in China*. *Sci Rep*. 2016;6(1).
- [187] Leendertse M, van Vugt M, Benschop KS, van Dijk K, Minnaar RP, van Eijk HWM, et al. *Pleurodynia caused by an echovirus 1 brought back from the tropics*. *J Clin Virol*. 2013;58(2):490–3.
- [188] Burr SE, Sillah A, Joof H, Bailey RL, Holland MJ. *An outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis associated with coxsackievirus A24 variant in The Gambia, West Africa*. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):692.
- [189] Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García J-J, Ortez C, et al. *Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia*. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(11):874–81.
- [190] Gosert R, Heininger U, Hirsch HH. *Enterovirus detection in patients with acute gastroenteritis in Switzerland*. *J Med Virol*. 2018;90(4):685–91.
- [191] Hong J, Kang B, Yeo S, Jee Y, Park J-H. *Pathogenesis of coxsackievirus B2 in mice: characterization of clinical isolates of the coxsackievirus B2 from patients with myocarditis and aseptic meningitis in Korea*. *J Vet Sci*. 2017;18(4):457.
- [192] BAIN HW, McLEAN DM, WALKER SJ. *Epidemic pleurodynia (Bornholm disease) due to Coxsackie B-5 virus. The inter-relationship of pleurodynia, benign pericarditis and aseptic meningitis*. *Pediatrics*. 1961;27:889–903.
- [193] CDC. *Non-Polio Enterovirus | Symptoms Non-Polio Enterovirus Infection | Picornavirus | CDC [Internet]*. [cited 2019 Mar 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/symptoms.html>
- [194] CDC. *Non-Polio Enterovirus | Transmission Non-Polio Enterovirus Infection | Picornavirus | CDC [Internet]*. [cited 2019 Mar 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/transmission.html>
- [195] Esposito S, Bosis S, Niesters H, Principi N. *Enterovirus D68 Infection*.

- Viruses. 2015;7(11):6043–50.
- [196] Royston L, Tapparel C. *Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC*. Viruses. 2016;8(1):16.
- [197] Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. *The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it*. Nat Rev Microbiol. 2018;16(6):368–81.
- [198] Smyth M, Pettitt T, Symonds A, Martin J. *Identification of the pocket factors in a picornavirus*. Arch Virol. 2003;148(6):1225–33.
- [199] Lloyd RE. *Enterovirus Control of Translation and RNA Granule Stress Responses*. Viruses. 2016;8(4):93.
- [200] Feng Q, Langereis MA, van Kuppeveld FJM. *Induction and suppression of innate antiviral responses by picornaviruses*. Cytokine Growth Factor Rev. 2014;25(5):577–85.
- [201] Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DJ, Hogle JM. *Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution*. Protein Sci. 1994;3(10):1651–69.
- [202] Lai J, Sam I-C, Chan Y. *The Autophagic Machinery in Enterovirus Infection*. Viruses. 2016;8(2):32.
- [203] Boros A, Pankovics P, Knowles NJ, Reuter G. *Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep*. J Gen Virol. 2012 Sep 1;93(Pt_9):1941–51.
- [204] Boros Á, Nemes C, Pankovics P, Bíró H, Kapusinszky B, Delwart E, et al. *Characterization of a novel porcine enterovirus in wild boars in Hungary*. Arch Virol. 2012 May 15;157(5):981–6.
- [205] Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, et al. *Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups*. J Virol. 2002 Jun;76(11):5813–21.

- [206] Wang M, He J, Lu H, Liu Y, Deng Y, Zhu L, et al. *A novel enterovirus species identified from severe diarrheal goats*. Jin D-Y, editor. PLoS One. 2017 Apr 4;12(4):e0174600.
- [207] Du J, Lu L, Liu F, Su H, Dong J, Sun L, et al. *Distribution and characteristics of rodent picornaviruses in China*. Sci Rep. 2016 Dec 29;6(1):34381.
- [208] CDC. *Non-Polio Enterovirus | Home | Picornavirus | CDC* [Internet]. [cited 2019 Mar 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/index.html>
- [209] Bracho MA, González-Candelas F, Valero A, Córdoba J, Salazar A. *Enterovirus Co-infections and Onychomadesis after Hand, Foot, and Mouth Disease, Spain, 2008*. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2223–31.
- [210] Ganorkar NN, Patil PR, Tikute SS, Gopalkrishna V. *Genetic characterization of enterovirus strains identified in Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD): Emergence of B1c, C1 subgenotypes, E2 sublineage of CVA16, EV71 and CVA6 strains in India*. Infect Genet Evol. 2017;54:192–9.
- [211] Kono R. *Apollo 11 disease or acute hemorrhagic conjunctivitis: a pandemic of a new enterovirus infection of the eyes*. Am J Epidemiol. 1975;101(5):383–90.
- [212] Onorato IM, Morens DM, Schonberger LB, Hatch MH, Kaminski RM, Turner JP. *Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by enterovirus type 70: an epidemic in American Samoa*. Am J Trop Med Hyg. 1985;34(5):984–91.
- [213] Medina NH, Haro-Muñoz E, Pellini AC, Machado BC, Russo DH, Timenetsky M do C, et al. *Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic in São Paulo State, Brazil, 2011*. Rev Panam Salud Publica. 2016;39(2):137–41.
- [214] Ghazali O, Chua KB, Ng KP, Hooi PS, Pallansch MA, Oberste MS, et al. *An outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in Melaka, Malaysia*. Singapore Med J. 2003;44(10):511–6.
- [215] Cortina G, Best D, Deisenberg M, Chiletto R, Butt W. *Extracorporeal membrane oxygenation for neonatal collapse caused by enterovirus myocarditis*. Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed. 2018;103(4):F370–6.

- [216] Liapounova NA, Mouquet F, Ennezat P V. *Acute myocardial infarction spurred by myopericarditis in a young female patient: Coxsackie B2 to blame.* Acta Cardiol. 2011;66(1):79-81.
- [217] Rudolph H, Schroten H, Tenenbaum T. *Enterovirus Infections of the Central Nervous System in Children.* Pediatr Infect Dis J. 2016;35(5):567-9.
- [218] Jain S, Patel B, Bhatt GC. *Enteroviral encephalitis in children: clinical features, pathophysiology, and treatment advances.* Pathog Glob Health. 2014;108(5):216-22.
- [219] Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García J-J, Ortez C, et al. *Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia.* Clin Microbiol Infect. 2017 Nov;23(11):874-81.
- [220] WHO. *Poliomyelitis* [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 18]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>
- [221] Suresh S, Forgie S, Robinson J. *Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review.* J Med Virol. 2018;90(1):3-7.
- [222] Chen CY, Chang YC, Huang CC, Lui CC, Lee KW, Huang SC. *Acute flaccid paralysis in infants and young children with enterovirus 71 infection: MR imaging findings and clinical correlates.* AJNR Am J Neuroradiol. 2001;22(1):200-5.
- [223] Perez-Velez CM, Anderson MS, Robinson CC, McFarland EJ, Nix WA, Pallansch MA, et al. *Outbreak of Neurologic Enterovirus Type 71 Disease: A Diagnostic Challenge.* Clin Infect Dis. 2007;45(8):950-7.
- [224] Lugo D, Krogstad P. *Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations and challenges.* Curr Opin Pediatr. 2016;28(1):107-13.
- [225] Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. *Global emergence of enterovirus D68: a systematic review.* Lancet Infect Dis. 2016;16(5):e64-75.
- [226] Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. *The Emergence of Enterovirus-D68.*

- Microbiol Spectr. 2016;4(3):105–19.
- [227] Cassidy H, Poelman R, Knoester M, Van Leer-Buter CC, Niesters HGM. *Enterovirus D68 – The New Polio?* Front Microbiol. 2018;9:2677.
- [228] Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. *Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi.* J Virol. 2012;86(7):3995–4008.
- [229] WHO. *WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome (SARS).* 2004.
- [230] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. *SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses.* Nat Rev Microbiol. 2016;14(8):523–34.
- [231] Wang M, Yan M, Xu H, Liang W, Kan B, Zheng B, et al. *SARS-CoV Infection in a Restaurant from Palm Civet.* Emerg Infect Dis. 2005;11(12):1860–5.
- [232] Hu B, Zeng L-P, Yang X-L, Ge X-Y, Zhang W, Li B, et al. *Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus.* Drosten C, editor. PLOS Pathog. 2017;13(11):e1006698.
- [233] WHO. *WHO | Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – The Kingdom of Saudi Arabia* [Internet]. WHO. World Health Organization; 2019 [cited 2019 Mar 19]. Available from: <https://www.who.int/csr/don/26-february-2019-mers-saudi-arabia/en/>
- [234] Goldstein SA, Weiss SR. *Origins and pathogenesis of Middle East respiratory syndrome-associated coronavirus: recent advances.* F1000Res. 2017;6:1628.
- [235] Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. *Early Transmission*

- Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia*. N Engl J Med. 2020 Mar 26;382(13):1199–207.
- [236] Paules C, Subbarao K. *Influenza*. Lancet. 2017 Aug 12;390(10095):697–708.
- [237] Fox SJ, Miller JC, Meyers LA. *Seasonality in risk of pandemic influenza emergence*. Koelle K, editor. PLOS Comput Biol. 2017 Oct 19;13(10):e1005749.
- [238] Ducatez MF, Pelletier C, Meyer G. *Influenza D virus in cattle, France, 2011–2014*. Emerg Infect Dis. 2015 Feb;21(2):368–71.
- [239] Wang B, Brand-Miller J. *The role and potential of sialic acid in human nutrition*. Eur J Clin Nutr. 2003 Nov 23;57(11):1351–69.
- [240] Ma W, Kahn RE, Richt JA. *The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications*. J Mol Genet Med. 2008 Nov 27;3(1):158–66.
- [241] Zhang G, Shoham D, Gilichinsky D, Davydov S, Castello JD, Rogers SO. *Evidence of Influenza A Virus RNA in Siberian Lake Ice*. J Virol. 2006;80(24):12229–35.
- [242] Worobey M. *Phylogenetic Evidence against Evolutionary Stasis and Natural Abiotic Reservoirs of Influenza A Virus*. J Virol. 2008;82(7):3769–74.
- [243] Parrish CR, Murcia PR, Holmes EC. *Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans*. J Virol. 2015;89(6):2990–4.
- [244] CReSA. *First detection of West Nile Virus in a bird of prey in Catalonia | CReSA & the city* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 10]. Available from: <http://www.cresa.cat/blogs/sociedad/en/primera-deteccio-del-virus-del-nil-occidental-en-una-au-rapac-a-catalunya/>
- [245] Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. *West Nile Virus: Review of the Literature*. JAMA. 2013 Jul 17;310(3):308.
- [246] CDC. *Symptoms, Diagnosis, & Treatment | West Nile Virus | CDC*

- [Internet]. [cited 2019 Mar 25]. Available from:
<https://www.cdc.gov/westnile/symptoms/index.html>
- [247] Nemeth NM, Young GR, Burkhalter KL, Brault AC, Reisen WK, Komar N. *West Nile Virus Detection in Nonvascular Feathers from Avian Carcasses*. J Vet Diagnostic Investig. 2009;21(5):616–22.
- [248] Komar N, Lanciotti R, Bowen R, Langevin S, Bunning M. *Detection of West Nile Virus in Oral and Cloacal Swabs Collected from Bird Carcasses*. Emerg Infect Dis. 2002;8(7):741–2.
- [249] Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, et al. *Alligators as West Nile virus amplifiers*. Emerg Infect Dis. 2004;10(12):2150–5.
- [250] Lund M, Shearn-Bochsler V, Dusek RJ, Shivers J, Hofmeister E. *Potential for Waterborne and Invertebrate Transmission of West Nile Virus in the Great Salt Lake, Utah*. Dudley EG, editor. Appl Environ Microbiol. 2017;83(14).
- [251] Jacobsen KH, Wiersma ST. *Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005*. Vaccine. 2010 Sep;28(41):6653–7.
- [252] Belliot G, Lopman BA, Ambert-Balay K, Pothier P. *The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection*. Clin Microbiol Infect. 2014 Aug 1;20(8):724–30.
- [253] Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. *Mild or Moderate Covid-19*. N Engl J Med. 2020 Oct 29;383(18):1757–66.
- [254] Ellul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, et al. *Neurological associations of COVID-19*. Vol. 19, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2020. p. 767–83.
- [255] Ramani S, Atmar RL, Estes MK. *Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development*. Vol. 30, Current Opinion in Gastroenterology. Curr Opin Gastroenterol; 2014. p. 25–33.
- [256] Rackoff LA, Bok K, Green KY, Kapikian AZ. *Epidemiology and Evolution of*

- Rotaviruses and Noroviruses from an Archival WHO Global Study in Children (1976–79) with Implications for Vaccine Design*. Sestak K, editor. PLoS One. 2013 Mar 25;8(3):e59394.
- [257] de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. *Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era?* Euro Surveill. 2015 Jul 2;20(26).
- [258] Kiulia NM, Mans J, Mwenda JM, Taylor MB. *Norovirus GII.17 Predominates in Selected Surface Water Sources in Kenya*. Food Environ Virol. 2014 Dec 1;6(4):221–31.
- [259] Eden JS, Hewitt J, Lim KL, Boni MF, Merif J, Greening G, et al. *The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012*. Virology. 2014 Feb;450–451:106–13.
- [260] Papanicolas LE, Wang Y, Choo JM, Gordon DL, Wesselingh SL, Rogers GB. *Optimisation of a propidium monoazide based method to determine the viability of microbes in faecal slurries for transplantation*. J Microbiol Methods. 2019 Jan 1;156:40–5.
- [261] Fuster N, Pintó RM, Fuentes C, Beguiristain N, Bosch A, Guix S. *Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters*. Water Res. 2016 Sep 15;101:226–32.
- [262] Michen B, Graule T. *Isoelectric points of viruses*. J Appl Microbiol. 2010 Jan 1;109(2):388–97.
- [263] Hemida MG, Chu DKW, Poon LLM, Perera RAPM, Alhammadi MA, Ng HY, et al. *Mers coronavirus in dromedary camel herd, Saudi Arabia*. Emerg Infect Dis. 2014;20(7):1231–4.
- [264] Xu D, Zhang Z, Jin L, Chu F, Mao Y, Wang H, et al. *Persistent shedding of viable SARS-CoV in urine and stool of SARS patients during the convalescent phase*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005 Mar 24;24(3):165–71.
- [265] Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. *A broadly*

- reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus.* J Virol Methods. 2006 Jan;131(1):65–71.
- [266] Lee G-H, Tan B-H, Teo EC-Y, Lim S-G, Dan Y-Y, Wee A, et al. *Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk.* Gastroenterology. 2016 Feb;150(2):355–7.
- [267] Bassal R, Wax M, Shirazi R, Shohat T, Cohen D, David D, et al. *Seroprevalence of hepatitis E virus in dromedary camels, Bedouins, Muslim Arabs and Jews in Israel, 2009–2017.* Epidemiol Infect. 2019 Feb 22;147:e92.
- [268] Siqueira JAM, Oliveira D de S, Carvalho TCN de, Portal TM, Justino MCA, da Silva LD, et al. *Astrovirus infection in hospitalized children: Molecular, clinical and epidemiological features.* J Clin Virol. 2017 Sep 1;94:79–85.
- [269] Jiang H, Holtz LR, Bauer I, Franz CJ, Zhao G, Bodhidatta L, et al. *Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes.* Virology. 2013 Feb 5;436(1):8–14.
- [270] Busquets N, Laranjo-González M, Soler M, Nicolás O, Rivas R, Talavera S, et al. *Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia).* Transbound Emerg Dis. 2019 Mar 26;66(2):617–21.
- [271] Kolodziejek J, Jungbauer C, Aberle SW, Allerberger F, Bagó Z, Camp J V., et al. *Integrated analysis of human-animal-vector surveillance: West Nile virus infections in Austria, 2015–2016.* Emerg Microbes Infect. 2018 Dec 1;7(1):1–15.
- [272] Drzewnioková P, Barzon L, Franchin E, Lavezzo E, Bakonyi T, Pisl J, et al. *The complete genome sequence analysis of West Nile virus strains isolated in Slovakia (central Europe).* Arch Virol. 2019 Jan 22;164(1):273–7.
- [273] Hubálek Z, Kosina M, Rudolf I, Mendel J, Straková P, Tomešek M. *Mortality of Goshawks (Accipiter gentilis) Due to West Nile Virus Lineage*

2. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2018 Nov 1;18(11):624–7.
- [274] Bakonyi T, Gajdon GK, Schwing R, Vogl W, Häbich AC, Thaller D, et al. *Chronic West Nile virus infection in kea (Nestor notabilis)*. Vet Microbiol. 2016 Feb 1;183:135–9.