

Artículo de revisión

Detección de virus gastrointestinales en aguas residuales como herramienta de vigilancia epidemiológica

Alejandra Carolina Zamora-Figueroa^{a,b*}, Marjorie del Carmen Bastardo-Méndez^a, Alba Elisabeth Farias Maza^a, Esmeralda Vizzi^{c*}

^aLaboratorio de Ecología de Microorganismos. Centro de Ecología Aplicada. Instituto de Zoología y Ecología Tropical. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. ^bLaboratorio de Virología Molecular. Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. ^cLaboratorio de Biología de Virus. Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela

Recibido 020 de mayo de 2025; aceptado 03 de julio de 2025

<https://doi.org/10.6983/RSVM.2025.1.45.02>

Resumen: Los virus gastrointestinales se replican en el intestino de las personas infectadas, por lo que su presencia en aguas residuales está relacionada con la excreción de partículas virales a través de las heces. La infección por virus gastrointestinales está entre las diez primeras causas de muerte en humanos de países en desarrollo. En esta revisión, se analizan la presencia de virus gastrointestinales en aguas residuales, metodologías para la extracción y detección de estos virus y la importancia de la vigilancia ambiental. Se realizó una revisión bibliográfica en las bases de datos PubMed, Google Scholar, ScienceDirect y SciELO; siguiendo las directrices de Elementos Preferidos para Informes de Revisiones Sistemáticas y Meta-Análisis (PRISMA, por sus siglas en inglés). Se obtuvo una base de datos constituida por 50 artículos de investigación sobre el tema, realizados en 30 países y en los cuales se observó una variedad de metodologías empleadas para la concentración viral y posterior detección de los virus. Las herramientas de biología molecular resultaron indispensables para la detección e identificación. Los virus más estudiados fueron norovirus (74 %), rotavirus (50 %) y adenovirus (44 %). Finalmente, se destaca la importancia de la vigilancia ambiental de los virus gastrointestinales como estrategia para la orientación de políticas públicas preventivas.

Palabras clave: virus gastrointestinales, aguas residuales, epidemiología de aguas residuales, vigilancia ambiental.

Detection of gastrointestinal viruses in wastewater as a tool for epidemiological surveillance

Abstract: Gastrointestinal viruses replicate in the intestines of infected individuals, so their presence in wastewater is linked to the excretion of viral particles through feces. Gastrointestinal virus infection is among the top ten causes of death in humans in developing countries. This review analyzes the presence of gastrointestinal viruses in wastewater, methodologies for their extraction and detection, and the importance of environmental surveillance. A literature review was conducted using PubMed, Google Scholar, ScienceDirect, and SciELO databases, following the Preferred Reporting Items for Systemic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. A database comprising 50 research articles on the topic was obtained, conducted in 30 countries. These articles showcased a variety of methodologies employed for viral concentration and subsequent virus detection. Molecular biology tools proved indispensable for detection and identification. The most studied viruses were norovirus (74 %), rotavirus (50 %), and adenovirus (44 %). Finally, the importance of environmental surveillance of gastrointestinal viruses is highlighted as a strategy to guide preventive public health policies.

Keywords: gastrointestinal viruses, wastewater, wastewater epidemiology, environmental surveillance.

* Correspondencia:

e-mail: alejandra.zamora@gmail.com | evizzi.ala@gmail.com

ORCID: AZ: 0000-0002-5198-8499 | EV: 0000-0001-6865-1617

Introducción

Alrededor del mundo las personas producen aguas residuales, siendo éstas efluentes representativos de los residuos colectivos en una zona determinada, las cuales constituyen una matriz compleja que contiene, además de sustancias químicas, una gran diversidad de microorganismos. Los virus gastrointestinales entran al cuerpo humano a través del agua o de los alimentos contaminados, donde infectan el aparato digestivo y son excretados en las heces, por lo que se los denomina virus entéricos. Impactan principalmente a personas en edades extremas (niños menores de 5 años y ancianos), o individuos con deficiencias inmunitarias, tanto en forma epidémica como endémica [1].

Los virus gastrointestinales se replican en el intestino de las personas infectadas, por lo que su presencia en aguas residuales está relacionada con altos niveles de excreción de partículas virales, que oscilan entre 10^5 a 10^{12} por gramo de heces [2]. Así, las partículas virales pueden llegar al medio acuático a través de las descargas de aguas residuales y su presencia en los recursos hídricos se considera un problema de salud pública, especialmente en lugares donde la cobertura de saneamiento básico es insuficiente.

La infección por virus entéricos humanos está entre las diez primeras causas de muerte de personas que viven en países en desarrollo [3]. Suele ser asintomática en personas sanas, pero puede causar síntomas clínicos muy variables que van desde diarrea leve hasta síntomas crónicos o graves en niños pequeños, ancianos e individuos inmunosuprimidos [4]. Estos virus tienen transmisión vía fecal-oral, por contacto directo, a través del agua, los alimentos o el ambiente, y debido a esto desempeñan un papel importante en los brotes y casos ocasionales de gastroenteritis asociada al agua, creando un círculo de infección [5].

La contaminación del agua con patógenos se ha convertido en una preocupación mundial, particularmente a causa de que los virus gastrointestinales pueden resistir los tratamientos de desinfección de las plantas de tratamientos, problema que es mucho más grave en aquellos países en los cuales las aguas no tratadas son descargadas directamente en cuerpos de agua superficiales. En esta revisión, se analiza la presencia de virus gastrointestinales en aguas residuales, las metodologías para la extracción y detección de partículas virales en muestras de aguas residuales y la importancia de la vigilancia ambiental a través del enfoque de su epidemiología.

Materiales y métodos

Entre el 4 y el 5 de abril de 2025 se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed (*National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland*), ScienceDirect (Elsevier BV), Google Scholar (*Google, Mountain View, California*) y SciELO (*Scientific Electronic Library Online, São Paulo, Brasil*). De acuerdo con la estrategia de búsqueda, se eligieron y fusionaron las siguientes palabras clave: “*gastrointestinal virus*”, “*gastroenteritis*”, “*seawage*”, “*enteric viruses*”, “*wastewater*”, “*surveillance*”. Se consideraron todos los artículos publicados entre 2015 y 2025 (últimos diez años). Siguiendo las directrices de los Elementos Preferidos para Informes de Revisiones Sistemáticas y Meta-Análisis (PRISMA, por sus siglas en inglés) [6], y de acuerdo con la estrategia de búsqueda, se incluyeron artículos relevantes que contenían las palabras clave seleccionadas en alguna parte del texto, y como resultado se obtuvo un total de 95 artículos.

Para el cribado, primero se eliminaron los artículos duplicados ($n=15$), seguido de una revisión de títulos, y resúmenes de todos los artículos recuperados mediante la búsqueda de palabras clave. Luego de esta revisión se excluyeron los artículos de revisión y aquellos que no se adecuaban al objetivo de este trabajo (17 artículos). Posteriormente, se seleccionaron 63 artículos, de los cuales finalmente se seleccionaron 50 artículos. Los datos de estos artículos se registraron en una plantilla de MS Excel. El procedimiento de búsqueda y selección se indica en la figura 1.

Criterios de inclusión: Se seleccionaron artículos originales de revistas revisadas por pares que analizaron la presencia de virus gastrointestinales en muestras de aguas residuales, con el objetivo de evaluar su potencial como herramienta de vigilancia epidemiológica y en los cuales se identificaron y/o cuantificaron virus entéricos humanos en aguas residuales de cualquier origen (ej., municipales, hospitalarias, industriales). También se incluyeron aquellos que utilizaron métodos de detección molecular (ej., PCR, RT-PCR, qPCR), secuenciación u otros métodos para la identificación de virus gastrointestinales. Se consideraron estudios que proporcionaron información sobre la prevalencia, concentración o diversidad de virus gastrointestinales en las muestras de aguas residuales. No se aplicó restricción de idioma o región geográfica en la etapa inicial de la búsqueda.

Criterios de exclusión: Se excluyeron aquellos estudios que: a) no reportaban datos acerca de detección o

prevalencia de virus gastrointestinales; b) analizaron virus gastrointestinales en matrices ambientales distintas a aguas residuales (ej., aguas superficiales, alimentos, muestras clínicas); c) revisiones, metaanálisis, *personal views*, actas de congresos y resúmenes; d) estudios cuya naturaleza era principalmente procedimental o que únicamente compararon técnicas de muestreo o detección sin presentar datos originales sobre la presencia de virus en aguas residuales; e) estudios que se enfocaron en virus no entéricos o que no causan enfermedades gastrointestinales en humanos, f) aquellos artículos para los cuales no se pudo acceder al texto completo y g) estudios que se centraron exclusivamente en la detección o vigilancia de un único virus específico, ya que el objetivo era tener una visión más amplia de los virus gastrointestinales.

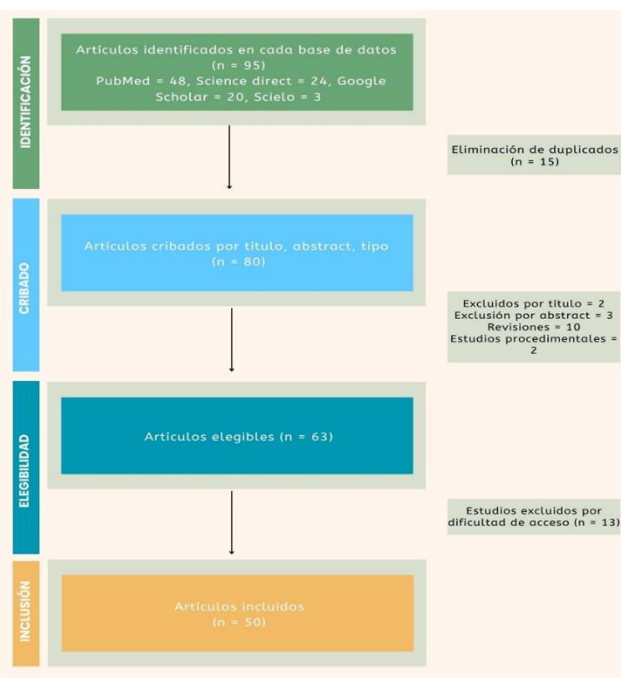


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de búsqueda, selección y revisión de artículos en bases de datos.

Virus gastrointestinales

Los patógenos virales que se transmiten por vía hídrica ambiental tienen un gran impacto socioeconómico tanto en los países desarrollados como en aquellos en desarrollo. En las matrices ambientales se han identificado una gran diversidad de virus causantes de gastroenteritis infecciosa. Las familias virales más comunes incluyen *Reoviridae* (rotavirus, RV), *Adenoviridae* (adenovirus humano, HAdV), *Astroviridae* (astrovirus, AsV), la familia *Caliciviridae* (norovirus, NoV y sapovirus, SaV) y *Picornaviridae* (enterovirus, EV; *Aichi virus*, AiV y hepatitis A, HAV) [5,7]. La tabla 1 resume las principales características de estos virus gastrointestinales incluyendo su taxonomía, características estructurales, epidemiología y disponibilidad de vacuna.

La familia *Reoviridae* incluye a los rotavirus, que son la principal causa de gastroenteritis viral en bebés y niños pequeños en todo el mundo y también en las crías de una gran variedad de especies animales [8]. Son virus esféricos con un diámetro de aproximadamente 70 nm, sin envoltura y con estructura en forma de rueda, lo cual es el rasgo característico de los viriones de rotavirus (Tabla 1). Las partículas de rotavirus tienen simetría icosaédrica y la cápside consta de tres capas concéntricas de proteína que miden aproximadamente 1 000 Å de diámetro, incluyendo las espigas. El genoma consta de 11 segmentos de ARN bicatenario (dsRNA). Cada segmento de ARN es un gen que codifica para una o dos proteínas [9].

Los rotavirus se dividen en nueve serogrupos (RVA-D, y RVF-J), según sus propiedades genéticas y antigénicas, de los cuales los grupos A, B y C se identifican como infectantes tanto para humanos como para animales. En particular, el rotavirus A (RVA) es la especie más importante y la principal causa de enfermedad en humanos a nivel mundial. Dentro de la especie A, los rotavirus se subdividen en genotipos G y P, basados en variaciones en las proteínas de la cápside VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P) [10]. Se han identificado numerosos genotipos G (G1 a G45), siendo G1, G2, G3, G4 y G9 los genotipos G más comunes que infectan a humanos, combinados con los tipos P, de los cuales se han descrito 58, siendo P[8], P[4] y P[6] los más comunes entre humanos. En particular, los RVA portadores de G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8] representan más del 90 % de las cepas de rotavirus humanos que circulan en la mayoría de los países [9].

A su vez, la familia *Adenoviridae* la constituyen virus no envueltos, de simetría icosaédrica y de tamaño mediano, entre 70-90 nm y un genoma de ADN bicatenario de doble cadena (dsDNA) (Tabla 1). Está constituida por 6 géneros: *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus* que probablemente han coevolucionado con mamíferos y aves; *Ichadenovirus* que infectan a peces; *Testadenovirus* presente en tortugas, y dos géneros con una gama más amplia de hospedadores, *Barthadenovirus* y *Siadenovirus*. Los adenovirus son específicos de cada especie y generalmente se replican solo en células derivadas de su huésped nativo. Dentro del género *Mastadenovirus* existen 7 diferentes especies (A-G), que incluyen 52 serotipos de adenovirus humanos (HAdV) y 116 genotipos, basados en sus atributos biológicos y genéticos [11]. Estos se asocian con diversas enfermedades infecciosas que afectan los tractos respiratorio, urinario, gastrointestinal y ocular [9].

Los HAdV presentan una cápside compuesta por un total de 252 capsómeros, de los cuales 240 son hexones y 12 son pentones y fibras, formando una estructura icosaédrica de ADN lineal de doble cadena, sino que también media la unión a las células huésped e inicia el proceso de infección. Esta composición proteica específica, así como

la estructura tridimensional de estas proteínas son características distintivas de los adenovirus humanos.

Por su parte, la familia *Astroviridae* se divide en dos géneros, *Mamastrovirus* (MAstVs) y *Avastrovirus* (AAstVs), que infectan especies de mamíferos y aves respectivamente, aunque debido a recientes descubrimientos de astrovirus, la taxonomía de este grupo se encuentra en estudio por el ICTV [9]. Los astrovirus humanos clásicos (HAstV) se clasifican en dos genogrupos, A y B, según la reactividad antigénica de las proteínas de la cápside. El genogrupo A incluye los serotipos HAstV-1 a HAstV-5 y HAstV-8, mientras que el genotipo B incluye los serotipos HAstV-6 y HAstV-7 [10]. Se ha reportado que el HAstV-1 es el más común a nivel mundial. Adicionalmente, dos grupos de astrovirus, MLB y VA/HMO (HAstV- MLB1 y MLB-2; HMOAstVs A, B, y C, HAstV-VA1 y VA2), infectan a los humanos y presentan una marcada divergencia genética con respecto a los HAstV [9].

Estructuralmente, los HAstV son viriones pequeños, con un tamaño que oscila entre 28 y 30 nm de diámetro y un genoma compuesto por una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo (+ssRNA) [9] (Tabla 1). Presentan simetría icosaédrica y una cápside compuesta por 180 subunidades proteicas. La característica más distintiva es la presencia de espículas ubicadas en los vértices de la cápside, de aproximadamente 4-5 nm de longitud, que sobresalen de la superficie dándoles una apariencia estrellada.

La familia *Caliciviridae*, conformada por norovirus y sapovirus, presentan como características comunes la presencia de una única proteína estructural principal, a

partir de la cual se construye la cápside y la aparición de 32 depresiones en forma de copa en la superficie del virión, dispuestas en una simetría icosaédrica [9]. Los NoV y los SaV forman clados filogenéticos distintos dentro de la familia *Caliciviridae*, diferenciándose entre ellos por las características de organización de su genoma. El genoma del NoV y SaV es de ARN poliadenilado monocatenario de sentido positivo [9]. El NoV se clasifica en diez genogrupos distintos (GI-GX), que a su vez se subdividen en diferentes genotipos. Se han identificado los genogrupos GI, GII, GIV, GVIII y GXIX en humanos. La mayoría de los aislamientos humanos pertenecen a los genogrupos GI y GII, que a su vez se subdividen en 36 genotipos (GI.1-9, GII.1-28 y GII.15 que ha sido retirado). Los norovirus y sapovirus también difieren en su epidemiología, por ejemplo, los NoVs pueden infectar a humanos de cualquier edad, y se asocian a brotes de gastroenteritis aguda por alimentos o agua contaminados; mientras que los SaV infectan principalmente a bebés y niños pequeños [12] (Tabla 1).

La familia *Picornaviridae* es una de las familias virales más grandes conocidas, con 63 géneros que contienen 147 especies, y aún está creciendo con muchos virus en espera de clasificación. Los miembros de la familia *Picornaviridae* tienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo [13] y los viriones tienen simetría icosaédrica, sin envoltura, de alrededor de 30 nm de diámetro (Tabla 1). Dentro de esta familia, destacan los EV, que es un grupo muy diverso de virus cuyas cápsides están compuestas por cuatro proteínas estructurales (VP1-VP4), dispuestas en 60 unidades protoméricas repetidas [9].

Tabla 1. Características biológicas y epidemiológicas de los principales virus gastrointestinales que afectan la salud humana

Virus	Taxonomía	Genoma	Tamaño	Ciclo Replicativo	Morfología	Patrón Epidemiológico	Vacuna Disponible
Rotavirus	Familia: <i>Reoviridae</i> Género: <i>Rotavirus</i>	ARN dc (11 segmentos)	~70 nm	Citoplasmático	Icosaédrica, doble capsida, con aspecto de "rueda"	Principal causa de diarrea grave en niños (<5 años)	(Rotarix®, RotaTeq®, Rotavac®, Rotasil®)
Norovirus	Familia: <i>Caliciviridae</i> Género: <i>Norovirus</i>	ARN sc (+), 7,5-7,7 kb	~27-40 nm	Citoplasmático	Icosaédrica, superficie rugosa	Niños y adultos de todas las edades. Brotes en comunidades, altamente contagioso (cruceros, escuelas)	No
Sapovirus	Familia: <i>Caliciviridae</i> Género: <i>Sapovirus</i>	ARN sc (+), 7,1-7,7 kb	~30-40 nm	Citoplasmático	Icosaédrica con "copas"	Niños y adultos, menos frecuente que norovirus	No
Astrovirus	Familia: <i>Astroviridae</i> Género: <i>Mamastrovirus</i>	ARN sc (+), 6,1-7,9 kb	~28-30 nm	Citoplasmático	Icosaédrica, forma de estrella	Niños (<2 años), ancianos e inmunosuprimidos	No
Adenovirus	Familia: <i>Adenoviridae</i> Género: <i>Mastadenovirus</i> (tipos F40/41 entéricos)	ADN dc, 30-38 kb	~70-90 nm	Nuclear	Icosaédrica, con fibras	Diarrea endémica en niños <5 años; crónico en inmunosuprimidos	No (excepto vacunas para militares)
Cosavirus	Familia: <i>Picornaviridae</i> Género: <i>Cosavirus</i>	ARN sc (+), 7,6 kb	~22-30 nm	Citoplasmático	Icosaédrica, pequeña	Asociación con diarrea no bien establecida	No
Aichi virus	Familia: <i>Picornaviridae</i> Género: <i>Kobuvirus</i>	ARN sc (+), 8,2-8,4 kb	~30 nm	Citoplasmático	Icosaédrica, irregular	Gastroenteritis asociada a mariscos contaminados	No
Klashevirus o salivirus	Familia: <i>Picornaviridae</i> Género: <i>Klashevirus</i>	ARN sc (+), 7,1-7,9 kb	~30 nm	Citoplasmático	Icosaédrica	Asociación con diarrea no bien establecida	No
Enterovirus	Familia: <i>Picornaviridae</i> Género: <i>Enterovirus</i> (Poliovirus, Coxsackie, Echovirus)	ARN sc (+), 7,2-7,5 kb	~28-30 nm	Citoplasmático	Icosaédrica	Poliomielitis, meningitis, enfermedad mano-pie-boca	Solo para poliovirus: Salk/IPV y Sabin/OPV)

ARN: ácido ribonucleico; ADN: ácido desoxirribonucleico; dc: doble cadena; sc: simple cadena; (+): polaridad positiva; kb: kilobases; nm:

Taxonómicamente, los EV se subdividían previamente en tres grupos: poliovirus, echovirus y coxsackievirus. A los EV aislados más recientemente se les asignaron números posteriormente (p. ej., EV 71 o EV A71). Actualmente, las especies del género *Enterovirus* que infectan humanos se denominan *Enterovirus A* (incluye coxsackievirus A y serotipos EV-A), *Enterovirus B* (incluye *Coxsackievirus B* y serotipos de *Echovirus*), *Enterovirus C* (incluye poliovirus y algunos serotipos *Coxsackievirus A* y *Rinovirus C*), *Enterovirus D* (incluye serotipos *Rinovirus D*), *Enterovirus H* (anteriormente denominado *Rinovirus A*) y *Enterovirus I* (anteriormente denominado *Rinovirus B*) [14]. La mayoría de las infecciones por EV son asintomáticas o causan síntomas leves, algunos gastrointestinales, y enfermedades como las de “manos, pies y boca”, y la herpangina. Su presencia en aguas residuales plantea su uso como indicadores de contaminación humana, sin subestimar que también pueden estar involucrados en graves complicaciones neurológicas [15].

Dentro de la familia *Picornaviridae* también se incluyen el *Aichi virus*, un virus citopático pequeño de forma redonda que se había reportado más comúnmente en brotes de gastroenteritis en Japón, asociándose con el consumo de ostras. Los viriones de *Aichi virus* (AiV) presentan características que los diferencian de cualquier otro género dentro de la familia *Picornaviridae*. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) propuso asignar este virus a un nuevo género llamado *Kobuvirus* [16]. Dentro de este género existen tres especies, pero solo el Aichi virus A infecta a los humanos. Similar a otros picornavirus, AiV presenta una estructura icosaédrica de aproximadamente 30 nm de diámetro. A diferencia de otros picornavirus, la cápside de los kobuvirus está compuesta por tres proteínas principales: VP0, VP1 y VP3, manteniendo VP0 sin escindir. Adicionalmente, una característica única de este virus es que presenta una estructura de hélice de poliprolina en el extremo C-terminal de VP1 que se cree tiene una función crucial en la unión a la célula huésped [9].

Otro de los virus con importancia en la salud humana, perteneciente a la familia *Picornaviridae* es el virus de la hepatitis A (HAV), un virus hepatotrópico, prototipo del género *Hepatovirus* que ocasiona inflamación y daño a las células del hígado. Se considera un virus gastrointestinal debido a que su vía de infección es fecal-oral. El HAV se clasificó originalmente como enterovirus tipo 72 porque sus características biofísicas son similares a las de los enterovirus. Es un virus con un genoma de ARN lineal monocatenario sentido positivo y su estructura se diferencia de otros géneros de esta familia debido a que la cápside es más lisa y carece de depresiones importantes. Por otra parte, El HAV puede existir en una forma “cuasi-envuelta”, donde la cápside está rodeada por membranas

derivadas del huésped, aunque carece de glicoproteínas virales típicas de los virus envueltos [8].

De acuerdo con la literatura, y desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones gastrointestinales virales de mayor impacto son causadas principalmente por el *Rotavirus* del grupo A, seguido por los *Norovirus*, *Sapovirus*, *Adenovirus* y *Astrovirus* [7] (Tabla 1). Si bien causan un cuadro clínico con características comunes, los síntomas varían ampliamente dependiendo de múltiples factores relacionados con el hospedero y la carga viral, y van desde manifestaciones leves como diarrea, vómitos, dolor abdominal hasta graves como la deshidratación, encefalitis y el edema pulmonar [17]. Menos frecuentemente, *Enterovirus*, *Aichi virus*, *Klassevirus* y *Cosavirus* también pueden causar gastroenteritis. Las edades afectadas y la distribución geográfica varían en función del tipo de virus, condiciones socioeconómicas, saneamiento, cobertura vacunal y patrones climatológicos (Tabla 1).

En particular, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) ha incorporado a los norovirus, enterovirus, virus de la hepatitis A y adenovirus en la Lista de Candidatos a Contaminantes (CCL, por sus siglas en inglés), catalogando estos virus como contaminantes emergentes presentes en el agua y que representan un riesgo para la salud pública [18].

Los virus gastrointestinales se introducen al medio ambiente a través del vertido de residuos tratados y no tratados, contaminando así el suelo, las aguas subterráneas, los ríos y el agua de mar. Debido a su estructura, los virus gastrointestinales (no envueltos) son más estables en el ambiente y más resistentes a los métodos actuales de tratamiento de aguas residuales. De hecho, se han reportado partículas virales infecciosas hasta por 130 días en agua de mar, hasta por 120 días en agua dulce y aguas residuales, y hasta por 100 días en el suelo a una temperatura de 20 a 30 °C [2].

Esto representa un riesgo significativo para la salud pública, pues incluso si los virus están presentes en el agua en bajas concentraciones, la dosis infecciosa es muy baja, generalmente de 1 a 10 unidades virales [19], por lo que la persistencia de los virus gastrointestinales en el agua crea un escenario de alto riesgo para la propagación de enfermedades entéricas.

Importancia de la vigilancia ambiental

Las aguas residuales urbanas sin tratar son una matriz compleja compuesta por orina, heces y descamación cutánea de las personas. Por lo tanto, contienen una gran variedad de virus, bacterias y protozoos patógenos y comensales excretados por miles de habitantes. Asimismo, las aguas residuales también contienen otros aportes no

humanos, que aumentan la diversidad de este complejo ecosistema.

En este contexto, los virus entéricos poseen una relevancia significativa en las aguas residuales debido a su elevada excreción por individuos infectados, su resistencia a los tratamientos convencionales, su prolongada capacidad de supervivencia en el medio ambiente y la exigua concentración necesaria para generar infecciones. A diferencia de otros microorganismos, como las bacterias, los virus humanos no crecen fuera de las células del hospedero, por lo tanto, la presencia de estos en aguas residuales refleja la transmisión dentro de una comunidad y pueden representar las concentraciones excretadas por la población humana correspondiente, a ser detectados en el tiempo suficiente en el que persisten [2,20].

La monitorización de las variaciones temporales en las concentraciones y la diversidad viral, presentes en muestras de aguas residuales comunitarias, constituye una herramienta clave para evaluar con precisión la magnitud real de las infecciones en la población [21]. Asimismo, permite la detección temprana de la aparición de nuevas cepas virales y potenciales brotes epidémicos. Este enfoque ha sido empleado desde 1947 en Estados Unidos para la vigilancia de poliovirus, y continúa siendo utilizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus esfuerzos de erradicación, además de servir para monitorear la circulación de variantes del virus derivadas de vacunas [22]. Desde entonces, numerosos estudios ambientales han detectado casi todos los virus entéricos humanos conocidos en aguas residuales y otros ambientes acuáticos [19].

Esta estrategia, denominada epidemiología basada en aguas residuales (*Wastewater-Based Epidemiology*, WBE) se ha consolidado como una herramienta esencial para la vigilancia de patógenos, no solo por su capacidad de ofrecer una visión poblacional de la circulación viral, sino también por su papel crítico en la protección ambiental y la prevención de crisis sanitarias [2]. A diferencia de la epidemiología tradicional, que depende únicamente de datos clínicos, la WBE permite recopilar información tanto de individuos sintomáticos como asintomáticos, lo que resulta especialmente útil en situaciones de brotes donde es común que muchos casos pasen desapercibidos [23].

El brote de la pandemia de SARS-CoV-2 en 2020 renovó el interés en la epidemiología basada en aguas residuales, que sirve tanto como herramienta de alerta temprana como método de vigilancia a largo plazo, para la propagación de un patógeno dentro de una población [24]. La figura 2 muestra el esquema general de la WBE, que ilustra el origen de las partículas virales a partir de personas infectadas (sintomáticas, asintomáticas o presintomáticas), su tránsito a través del sistema de alcantarillado, el muestreo, y las etapas posteriores de concentración, extracción de ácidos nucleicos y detección molecular (PCR

y secuenciación).

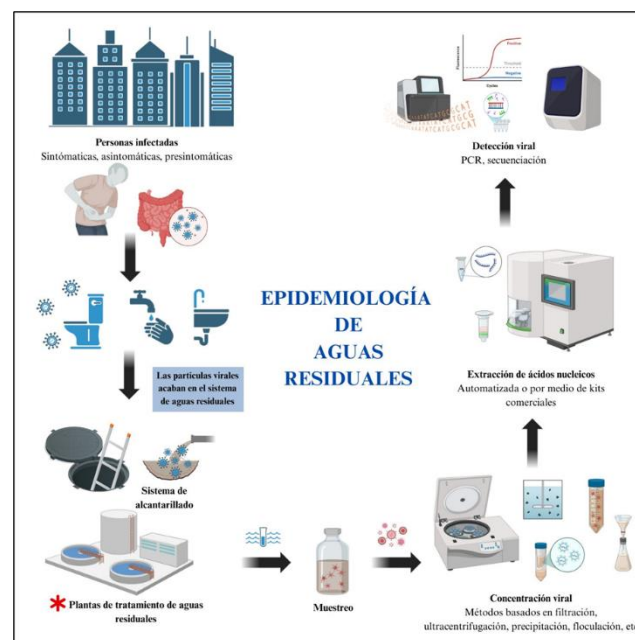


Figura 2. Esquema general de la epidemiología de aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés) para la detección de virus gastrointestinales en una comunidad. En Venezuela, dada la limitada o nula operatividad de las plantas de tratamiento de aguas residuales (indicado con *), el muestreo para la vigilancia viral se lleva a cabo directamente en las aguas residuales sin tratar del sistema de alcantarillado. Elaborado por los autores en Biorender.com

Esta aproximación metodológica adquiere especial relevancia al considerar el comportamiento de los virus entéricos en el ambiente acuático, puesto que, debido a la ausencia de envoltura lipídica, tienen la capacidad de persistir en cuerpos de agua al adsorberse a partículas sólidas o sedimentos [10,19], pudiendo incluso incorporarse a la cadena trófica a través de organismos filtradores como los bivalvos, lo que representa un riesgo significativo para la salud pública y los ecosistemas.

En este contexto, la vigilancia a través de WBE constituye una herramienta esencial para estimar la prevalencia viral, analizar su distribución geográfica y realizar la caracterización molecular o vigilancia genómica. Este enfoque proporciona una base sólida para estudiar la evolución de mutaciones a lo largo del tiempo y detectar variantes emergentes, aun en ausencia de muestras clínicas que confirmen su existencia [25].

La vigilancia de aguas residuales es un método eficaz y económico para detectar y analizar virus con potencial pandémico, proporcionando información clave sobre infecciones leves o asintomáticas y ayudando en la prevención de pandemias. Esto es de suma importancia en comunidades de bajos ingresos, donde las infecciones virales se subestiman debido a la falta de diagnóstico y al difícil acceso a los servicios de salud. Una de las ventajas del monitoreo de aguas residuales es que proporciona información sobre entornos con datos limitados de

vigilancia individual de enfermedades, donde las pruebas clínicas son subutilizadas o no están disponibles [2].

Por otra parte, se debe considerar que, en los últimos años, la escasez de agua y la aplicación de prácticas de reutilización más sostenibles han favorecido el uso de aguas residuales para diversos fines, como el riego de cultivos y zonas verdes, la reposición de cuencas fluviales y el uso de cisternas para inodoros, prácticas que favorecen la transmisión de estos virus al entrar en contacto directo con las personas. Asimismo, la descarga de aguas residuales sin tratar a aguas superficiales provoca la circulación de virus gastrointestinales en cuerpos de agua tales como ríos, playas o estuarios, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo y la transmisión de estas enfermedades infecciosas [26].

En Venezuela, el tratamiento de aguas residuales se ha considerado por debajo del promedio dentro de las regiones de América Latina y el Caribe. Estimaciones previas indicaron que más del 97 % de las aguas residuales sin tratar del país se vierten como efluentes al ambiente. En Venezuela se ha reportado la presencia de virus entéricos en efluentes domésticos de aguas residuales, que con mucha probabilidad refleja la transmisión dentro de la población de Caracas y la persistencia de un riesgo potencial para la salud pública, que requiere ser monitoreado adecuadamente [20].

Métodos de detección en aguas residuales no tratadas

La epidemiología de aguas residuales proporciona una metodología para analizar la composición, detectar desechos y cuantificar patógenos en las aguas residuales [27]. La vigilancia viral en las aguas residuales implica una serie de procedimientos sistemáticos, que comienzan con el muestreo de un sitio específico dentro de un sistema de recolección de aguas residuales y posteriormente pasan a las etapas de concentración, extracción y detección virales [28].

Este proceso, que consta de varias fases, se realiza de esta forma dada la naturaleza de las matrices de aguas residuales, que poseen una gran cantidad de sustancias inhibidoras y contaminantes que podrían producir resultados inexactos o erróneos, al reducir la sensibilidad de la detección y cuantificación de fragmentos genéticos. En esta revisión se incluyeron estudios que analizaron la ocurrencia de virus como el adenovirus humano (HAdV), Aichi virus (AiV), astrovirus (AstV), bocavirus (HBoV), calicivirus, cosavirus, enterovirus (no polio), hepatitis A y E (HAV y HEV), norovirus (NoV), parechovirus (HPeV), poliovirus (PV), rotavirus (RV) y sapovirus (SaV). Otros estudios también incluyeron, además de virus gastrointestinales, virus respiratorios como el SARS-CoV-2 y otros coronavirus, el virus de la influenza A y B, el virus sincitial respiratorio y rinovirus. De los 50 artículos

incluidos, los estudios se realizaron en 30 países, de los cuales la mayoría fueron realizados en Estados Unidos (9 estudios), Japón (5 estudios) y Reino Unido (4 estudios). Estos países representaron el 36 % del total de artículos revisados.

Muestreo: La aplicación de la epidemiología de aguas residuales no sigue un protocolo estándar, dado que las metodologías empleadas dependen de la capacidad técnica y el equipamiento disponible en los laboratorios de cada país. En cuanto al muestreo, es necesario llevar a cabo estudios preliminares para identificar los sitios adecuados (como plantas de tratamiento de aguas residuales - EDAR) y caracterizar a la población que es atendida por estos sitios, principalmente para conocer la cantidad de personas que depositan sus desechos en los mismos y poder realizar estimaciones correctas de la prevalencia viral. En ausencia de EDAR, el muestreo puede ser realizado alternativamente en alcantarillas comunitarias como es el caso de estudios realizados en Venezuela [20], pozos sépticos [29], drenajes abiertos [30], o cualquier sitio que reciba aguas residuales, siempre utilizando el equipo de protección personal (EPP) adecuado para mitigar los riesgos biológicos.

Dado que las aguas residuales no constituyen una mezcla homogénea y están bajo un flujo dinámico constante, se generan variaciones en la composición del agua de acuerdo con el sitio de muestreo, producto de oscilaciones en el caudal y la incorporación de sustancias [31]. Por ello, el diseño muestral resulta crucial como el resto de los pasos implicados en la aplicación de la epidemiología de aguas residuales, buscando minimizar errores y obtener muestras representativas de la dispersión viral [32].

En este sentido, Grassly *et al.* destacaron las diferencias geográficas en los métodos de muestreo: los países de ingresos bajos y medianos suelen utilizar un método de captación simple, el cual consiste en la recolección de una sola muestra en un momento específico, o una muestra trampa, como un hisopo de Moore [25]. Sin embargo, la representatividad de los resultados puede verse comprometida, ya que pasa por alto la influencia de factores como el caudal, el volumen total de aguas residuales, la temperatura y las variaciones en los perfiles de excreción viral. En países más desarrollados y con sitios de muestreo seguros, se utilizan soluciones de más alta tecnología como muestreadores automáticos, los cuales toman un volumen determinado cada cierto tiempo, conformando muestras compuestas. Si bien este método es el preferido para el monitoreo de aguas residuales, puesto que provee muestras más representativas del contenido viral, su alto costo restringe su adopción en regiones con recursos limitados [28].

Estas diferencias se reflejaron en los estudios revisados, con un porcentaje del 88 % de estudios con muestreos

realizados en EDAR urbanas, mientras el 2 % optó por alcantarillas comunitarias (ej. zonas residenciales o hospitales). El 10 % restante incluyó otros sistemas de drenaje, tales como pozos sépticos, aguas de baños de aeronaves, y cuerpos de aguas superficiales contaminadas (ríos, canales y estaciones de bombeo). Respecto a la técnica de recolección, predominó el muestreo simple (74 %), seguido del muestreo compuesto automatizado (18 %) y no automatizado (8 %). La utilización del muestro automatizado fue más prevalente en investigaciones realizadas en países de Europa y Norteamérica, lo que evidencia un mayor desarrollo infraestructural y acceso a tecnologías avanzadas.

Concentración viral: Una vez que las muestras llegan al laboratorio de destino en condiciones de refrigeración - esencial para preservar la integridad del material genético y evitar su degradación-, se procede al proceso de concentración viral. Esta etapa es crítica, ya que las aguas residuales contienen concentraciones virales significativamente menores en comparación con muestras clínicas (como heces u orina), lo que dificulta la detección y análisis de patógenos. Mediante esta técnica, se busca aumentar la carga viral hasta niveles detectables, superando así una de las principales limitaciones en el estudio de agentes infecciosos en matrices ambientales complejas. Este paso precede a la extracción del material genético, y ayuda a aumentar la sensibilidad del método y producir niveles detectables de ácido nucleico viral [33].

Los métodos de concentración varían según el virus objetivo debido a las diferencias estructurales entre virus envueltos y no envueltos, las cuales afectan propiedades fisicoquímicas como la estabilidad, la carga superficial o la afinidad por ciertos reactivos, y esto determina la eficacia de cada técnica [25]. Es por ello que no existe un método universal estandarizado capaz de concentrar todos los tipos virales y deben realizarse optimizaciones de protocolos de acuerdo con el grupo viral en estudio.

Actualmente se emplean varios procedimientos de concentración viral, los cuales se basan en técnicas de precipitación, filtración, centrifugación, floculación, adsorción de membranas o una combinación de estos principios [34]. Estos procedimientos fueron diseñados originalmente para la concentración de virus entéricos no envueltos, y en los últimos años, se ha ampliado su uso a virus respiratorios envueltos, arbovirus y virus emergentes o reemergentes [35].

En los 50 estudios evaluados, se identificó el uso de 16 procedimientos distintos para la concentración de los virus en aguas residuales. La técnica más empleada fue la precipitación con polietilenglicol (PEG), aplicada en 17 artículos, ya sea como único protocolo, en combinación o comparación con otros métodos. Los enfoques basados en adsorción por carga electrostática también destacaron, con

8 artículos empleando métodos basados en membranas electronegativas, ya sean de absorción-elución o absorción-extracción, y 6 artículos empleando filtros electropositivos NanoCeram®. Cabe destacar que en dos de los estudios los investigadores no emplearon ningún método de concentración, procediendo a una extracción y detección molecular directa con las muestras de aguas residuales crudas [36,37]. En la tabla 2 se resumen los métodos empleados con sus ventajas y desventajas [38-75].

La heterogeneidad metodológica observada en los estudios evidencia que la concentración viral, pese a su rol fundamental en la detección de patógenos entéricos, carece aún de un protocolo universal. La elección del método depende críticamente de factores como el tipo viral (envuelto vs. no envuelto), el costo operativo y la complejidad de la matriz (ej. turbidez, carga orgánica, pH, presencia de inhibidores de PCR). Para virus gastrointestinales, mayoritariamente no envueltos y altamente resistentes, técnicas como la precipitación química o la adsorción electrostática han demostrado ser las más reproducibles, aunque persisten desafíos en la estandarización de eficiencias de recuperación. Esta variabilidad metodológica no solo refleja las limitaciones técnicas actuales, sino también la necesidad de adaptar protocolos a recursos y objetivos epidemiológicos específicos. Una vez concentrado el material viral, el siguiente desafío reside en la extracción eficiente de ácidos nucleicos y su posterior detección, etapas donde la calidad del concentrado obtenido condicionará directamente la sensibilidad analítica.

Extracción de ácidos nucleicos: Para la extracción de ácidos nucleicos (ADN/ARN), a partir de los concentrados virales, suelen emplearse métodos automatizados y también kits de extracción comerciales. Existen kits que son específicos para muestras ambientales complejas y también se utilizan kits para muestras humanas. El proceso de aislamiento del material genético generalmente implica etapas de lisis, purificación y recuperación [76]. Frente a los kits comerciales, los métodos automatizados ofrecen ventajas como un menor tiempo de procesamiento y una mejora en la pureza de la muestra al minimizar la co-extracción de contaminantes comunes en aguas residuales [77]. Sin embargo, suelen ser más costosos y, en algunos casos, pueden no ser tan efectivos como los kits comerciales, lo que limita su aplicación en la vigilancia basada en aguas residuales (WBE).

En la mayoría de los estudios revisados (66 % del total), los protocolos de extracción se basaron en métodos manuales empleando kits comerciales. Las plataformas automatizadas de extracción fueron utilizadas en el 28 % de los casos, mientras que un 6 % de las investigaciones no detallaron la metodología aplicada. Entre los kits comerciales, los de la marca QIAGEN (Hilden, Alemania)

fueron los más utilizados. Otras marcas como Zymo Research, Thermo Fisher Scientific, Roche, Macherey-Nagel, Promega y Geneaid también figuraron, aunque con menor representación. Respecto a la extracción automatizada, la plataforma más citada fue el sistema NucliSENS® EasyMag™ de BioMérieux (Francia) (Tabla 3).

Tabla 2. Metodologías de concentración en aguas residuales.

Metodologías	Ventajas	Limitaciones	Referencias
Métodos basados en precipitación química			
Precipitación por polietilenglicol	Métodos fáciles de emplear, se pueden usar con volúmenes grandes y no son costosos	Puede ocurrir co-precipitación de inhibidores de PCR Baja recuperación de virus pequeños	[10, 17, 19-21, 24, 29, 30, 37-44]
Precipitación con sulfato de amonio		Requieren centrifugación adicional	[45,46]
Precipitación con cloruro de aluminio			[10, 41, 47]
Floculación orgánica con leche descremada			[4, 19, 48-51]
Métodos basados en filtración física			
Filtración por membranas (sin carga)	Bajo costo	Los filtros pueden obstruirse al filtrar muestras con altas cargas de sedimentos	[38, 43, 48, 52-55]
Sistema de filtración con bolsa (BMFS) [56]	Puede realizarse en campo Procesa altos volúmenes de muestra (3-10 L) Mayor sensibilidad		[50, 57]
Filtración de flujo tangencial	Ideal para virus envueltos Menor obstrucción	Equipo costoso Procesa volúmenes pequeños	[21, 39]
Ultrafiltración centrífuga	Alta pureza	Algunos dispositivos requieren acondicionamiento	[10, 52,53, 58-60]
Métodos basados en la adsorción por carga			
Filtros electropositivos	Alta recuperación Método rápido y sencillo No requiere acondicionamiento de la muestra	Requiere ajuste de pH Puede ocurrir interferencia con iones divalentes Obstrucción con muestras muy turbias	[19,51, 61-64]
Membranas electronegativas	Compatible con secuenciación Aplicable a varios tipos de virus	Baja eficiencia en aguas duras Costo moderado Pueden formarse precipitados por la adición de sales	[10, 60, 65-70]
Métodos de afinidad/Inmunocaptura			
Nanotrap® Particles (NMAP) [72]	Alta afinidad por varios tipos de virus Costo-efectivo Mayor sensibilidad	Requiere equipamiento especializado Potencial inhibición de PCR Procesa volúmenes pequeños de muestra	[43, 55, 68]
Métodos basados en centrifugación			
Centrifugación simple	Fácil de realizar	Baja recuperación viral	[30, 72]
Ultracentrifugación	Alta pureza Aplicable a varios tipos de virus	Equipo altamente costoso No aplicable a grandes volúmenes de muestra Tiempo de procesamiento muy alto	[22, 54, 61, 73, 74]
Métodos de separación por fases			
Método de separación en dos fases	Procesa grandes volúmenes Alta recuperación de virus no envueltos	Tiempo de procesamiento alto	[26, 75]
Partición sólido-líquido	Bajo costo Fácil de implementar	Pérdida de virus en fase líquida Baja eficiencia en muestras diluidas	[72]
Métodos mecánicos			
Pipeta concentradora	Instrumento automatizado Alta sensibilidad Alta eficiencia de recuperación	Alto costo Requiere centrifugación adicional	[50, 67]

Detección: El análisis de los métodos de detección empleados en los 50 estudios revisados revela una clara tendencia hacia las técnicas moleculares, siendo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en sus diversas modalidades, la técnica predominante. En

particular la PCR cuantitativa (qPCR) y la PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR), se utilizan ampliamente para detectar virus gastrointestinales en aguas residuales, puesto que son muy sensibles y específicas, permitiendo identificar y cuantificar los genomas virales en las muestras. La RT-qPCR permite detectar bajas concentraciones de ARN viral en muestras de aguas residuales [78,79]. Esta técnica fue utilizada en el 54 % de los artículos analizados.

Adicionalmente, se observó el uso de enfoques más avanzados como la PCR multiplex, la PCR digital de gotas (ddPCR) y también la secuenciación de próxima generación (NGS), lo que subraya la creciente sofisticación en la caracterización de la diversidad viral presente en este tipo de matrices ambientales. Además, se observó una proporción significativa de investigaciones que incorporaron técnicas de PCR combinadas con secuenciación (28 %), lo que refleja un interés en obtener información más detallada sobre la diversidad genética viral y la identificación correcta de los fragmentos amplificados.

Por otra parte, los métodos metagenómicos (como la NGS) suelen ser más conservadores en la detección viral comparados con técnicas convencionales (p. ej., qPCR), teniendo la ventaja de identificar virus no cuantificados rutinariamente por qPCR, ampliando el espectro de detección [80,81].

La combinación de estas metodologías, en algunos casos, con etapas de ensayos en placa [45] o cultivo celular, se orienta a complementar la información genómica con datos de infectividad viral.

Respecto a los virus investigados en los 50 artículos revisados, los más frecuentes fueron norovirus (74 %), rotavirus (50 %) y adenovirus (44 %). En varios de los artículos se realizó la detección simultánea de estos virus junto con otros en menor proporción. El norovirus es la principal causa de gastroenteritis no bacteriana a nivel global [82], con brotes frecuentes en comunidades cerradas, lo que justifica su vigilancia en aguas residuales para identificar fuentes de contagio. Por su parte, el rotavirus es un biomarcador clave para evaluar la eficiencia de las campañas de inmunización [83] y el adenovirus, además de su asociación con enfermedades gastrointestinales y respiratorias, persiste en el ambiente por su estructura estable, actuando como indicador de contaminación fecal prolongada [84].

Consideraciones finales

Existe una diversidad de virus asociados a enfermedades gastrointestinales alrededor del mundo. La persistencia de estos virus en el ambiente, en particular en las aguas residuales, hace posible su detección y vigilancia a través de la epidemiología de aguas residuales. Para este fin no

hay una metodología estandarizada, pues este aspecto depende de la disponibilidad de recursos e infraestructura de cada laboratorio. A pesar de ello, las técnicas han evolucionado cada vez más hacia el uso de herramientas de biología molecular y secuenciación masiva. Sin embargo, aún hay limitaciones metodológicas que superar, principalmente en las etapas de muestreo, para lograr verdadera representatividad en las muestras.

Es fundamental priorizar el tratamiento de las aguas residuales pues su vertido en cuerpos de agua superficiales representa una vía directa para la propagación de estos virus en entornos comunitarios. El enfoque de Una Sola Salud (*One Health*) nos exhorta a neutralizar el daño ambiental como una forma de prevención de futuras epidemias. La vigilancia ambiental de enfermedades infecciosas emerge como un pilar para diseñar y ejecutar políticas preventivas de salud pública eficaces, tales como esfuerzos de vacunación en comunidades vulnerables.

Tabla 3. Metodologías de extracción en aguas residuales

Método/Kit	Tipo	Marca	Referencias
TRIzol (fenol – cloroformo)	Manual	-	[29, 48, 52]
Kits comerciales			
All Prep Power Viral DNA/RNA kit	Manual	QIAGEN (Alemania)	[17]
Kit QIAamp Viral RNA Kit/Mini Kit	Manual	QIAGEN (Alemania)	[22, 29, 30, 49, 62, 63, 67, 68, 74]
Kit Qiagen RNeasy Mini Kit/Kit RNeasy PowerWater	Manual	QIAGEN (Alemania)	[10, 48, 53, 57, 64-67, 70]
Kit DNeasy PowerSoil Pro	Manual	QIAGEN (Alemania)	[50, 58]
Kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Manual	QIAGEN (Alemania)	[61]
Kit QIAamp DNA Blood Maxi	Manual	QIAGEN (Alemania)	[54]
DNeasy blood and tissue kit	Manual	QIAGEN (Alemania)	[51]
Viral Nucleic Acid Extraction Kit II	Manual	Geneaid Biotech Ltd. (Taiwán)	[20, 42]
Kit NucleoSpin RNA Virus	Manual	Macherey-Nagel (Alemania)	[38, 73]
Kit ZymoBIOMICS RNA/DNA	Manual	ZymoResearch (USA)	[52]
Maxwell® RSC Pure Food GMO and Authentication Kit	Manual	PROMEGA (USA)	[47]
MagMAX-96 viral RNA isolation kit	Manual	ThermoFisher (USA)	[59]
Pure Link Viral DNA/RNA mini kit	Manual	ThermoFisher (USA)	[60]
High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit	Manual	Roche (Suiza)	[55]
Plataformas automatizadas			
NucliSENS® EasyMag™ platform	Automática	BioMérieux (Francia)	[19, 50, 24, 39-41, 43, 46]
KingFisher 96 extraction platform	Automática	ThermoFisher (USA)	[37, 45]
QIAasympHony	Automática	QIAGEN (Alemania)	[5]
NGSmaster Pure	Automática	Hangzhou Jieyi Biotechnology Co., Ltd. (China)	[36]
MagNA Pure LC 2.0	Automática	Roche (Suiza)	[69]
Chemagic 360 Instrument	Automática	Revvity (USA)	[72]

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Financiamiento

No se recibió financiamiento para la elaboración de este artículo de revisión.

Referencias

1. Stuempfig ND, Tobin EH, Seroy J, Labat-Butler JR. Viral Gastroenteritis (Nursing). 2025 May 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL):StatPearls Publishing; 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568704/>
2. Quintão TSC, Silva FG, Pereira AL, Araújo WN, Oliveira PM, Souza MBLD, et al. Detection and molecular characterization of enteric adenovirus in treated wastewater in the Brazilian federal district. SN Appl Sci. 2021; 3:691. DOI: [10.1007/s42452-021-04678-2](https://doi.org/10.1007/s42452-021-04678-2)
3. World Health Organization. Newsroom/Fact sheets/Detail. The top 10 causes of death. 7 August 2024. Geneva:World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
4. Guarino A, Bruzzese E. Viral Diarrhea. In: Guandalini S, Dhawan A, Branski D (Eds). Textbook of pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. Cham, Swiss:Springer; 2016. DOI: [10.1007/978-3-319-17169-2_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-17169-2_14)
5. Cioffi B, Monini M, Salamone M, Pellicanò R, Di Bartolo I, Guida M, et al. Environmental surveillance of human enteric viruses in wastewaters, groundwater, surface water and sediments of Campania Region. Reg Stud Mar Sci. 2020; 38:101368. DOI: [10.1016/j.rsma.2020.101368](https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101368)
6. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG for the PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. BMJ. 2009; 339:b2535. DOI: [10.1136/bmj.b2535](https://doi.org/10.1136/bmj.b2535)
7. Orenstein R. Gastroenteritis, Viral. In: Encyclopedia of Gastroenterology. Ernst J Kuipers (Ed). Amsterdam, Netherlands:Elsevier; 2019. pp 652-7. DOI: [10.1016/B978-0-12-801238-3.65973-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65973-1)
8. Stuart DI, Ren J, Wang X, Rao Z, Fry EE. Hepatitis A virus capsid structure. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019; 9:a03180. DOI: [10.1101/cshperspect.a031807](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031807)
9. Buesa J, Rodriguez-Díaz J. The molecular virology of enteric viruses. In: Goyal S, Cannon J (Eds). Viruses in foods. Food microbiology and food safety. Cham, Swiss:Springer; 2016. DOI: [10.1007/978-3-319-30723-7_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7_3)
10. Shaheen MNF, Abd El-Daim SE, Ahmed NI, Elmahdy EM. Molecular detection of three gastroenteritis

- viruses in an urban sewage treatment plant and river water in Egypt. *Egypt J Aquat Biol Fish*. 2018; 22:615-27. DOI: [10.21608/ejabf.2018.60278](https://doi.org/10.21608/ejabf.2018.60278)
11. Human Adenovirus Working Group. [Internet]. March, 2024. <http://hadvwg.gmu.edu/>
 12. Shaheen MNF, Elmahdy EM. Seasonal prevalence and detection of enteric and respiratory viruses in wastewater and hospitalized children with acute gastroenteritis. *Curr Microbiol*. 2024; 81:337. DOI: [10.1007/s00284-024-03841-3](https://doi.org/10.1007/s00284-024-03841-3)
 13. Bosch A, Carcereny A, García-Pedemonte D, Fuentes C, Costafreda MI, Pintó RM, *et al*. Human enteroviruses and the long road to acute flaccid paralysis eradication. *J Appl Microbiol*. 2025; 136:lxae311. DOI: [10.1093/jambio/lxae311](https://doi.org/10.1093/jambio/lxae311)
 14. ICTV.Global [Internet]. Virus taxonomy. Book: Picornaviridae. Family: Picornaviridae. Genus: Enterovirus. USA:National Institute of Allergy and Infectious Diseases. National Institutes of Health; 2025. <https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/enterovirus>
 15. Chio CC, Chien JC, Chan HW, Huang HI. Overview of the trending enteric viruses and their pathogenesis in intestinal epithelial cell infection. *Biomedicines*. 2024; 12:2773. DOI: [10.3390/biomedicines12122773](https://doi.org/10.3390/biomedicines12122773)
 16. ICTV.Global [Internet]. Virus taxonomy. Book: Picornaviridae. Family: Picornaviridae Genus: Kobuvirus. USA:National Institute of Allergy and Infectious Diseases. National Institutes of Health; 2025. <https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/kobuvirus>
 17. Nema RK, Singh S, Singh AK, Sarma DK, Diwan V, Tiwari RR, *et al*. Protocol for detection of pathogenic enteric RNA viruses by regular monitoring of environmental samples from wastewater treatment plants using droplet digital PCR. *Sci One Health*. 2024; 3:100080. DOI: [10.1016/j.soh.2024.100080](https://doi.org/10.1016/j.soh.2024.100080)
 18. EPA. United States Environmental Protection Agency. Drinking water contaminant candidate list (CCL) and regulatory determination [Internet]. Washington (DC):Environmental Protection Agency (EPA); 2025. <https://www.epa.gov/ccl>
 19. Iaconelli M, Muscillo M, Della Libera S, Fratini M, Meucci L, De Ceglia M, *et al*. One-year surveillance of human enteric viruses in raw and treated wastewaters, downstream river waters, and drinking waters. *Food Environ Virol*. 2017; 9:79-88. DOI: [10.1007/s12560-016-9263-3](https://doi.org/10.1007/s12560-016-9263-3)
 20. Zamora-Figueroa A, Rosales RE, Fernández R, Ramírez V, Bastardo M, Fariás A, *et al*. Detection and diversity of gastrointestinal viruses in wastewater from Caracas, Venezuela, 2021-2022. *Virology*. 2024; 589:109913. DOI: [10.1016/j.virol.2023.109913](https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109913)
 21. Bisseux M, Colombet J, Mirand A, Roque-Afonso AM, Abravanel F, Izopet J, *et al*. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Euro Surveill*. 2018; 23:17-00237. DOI: [10.2807/1560-7917.es.2018.23.7.17-00237](https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2018.23.7.17-00237)
 22. Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Martínez-Puchol S, Rusiñol M, Rodríguez-Manzano J, Figuerola N, *et al*. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. *Sci Total Environ*. 2018; 618:870-80. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2017.08.249](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.249)
 23. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, *et al*. SARS-CoV-2 in wastewater: state of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ*. 2020; 739:139076. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.139076](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076)
 24. Verani M, Pagani A, Federigi I, Lauretani G, Atomsa NT, Rossi V, *et al*. Wastewater-based epidemiology for viral surveillance from an endemic perspective: evidence and challenges. *Viruses*. 2024; 16:482. DOI: [10.3390/v16030482](https://doi.org/10.3390/v16030482)
 25. Grassly NC, Shaw AG, Owusu M. Global wastewater surveillance for pathogens with pandemic potential: opportunities and challenges. *Lancet Microbe*. 2025; 6:100939. DOI: [10.1016/j.lanmic.2024.07.002](https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.002)
 26. Atabakhsh P, Kargar M, Doosti A. Molecular detection and genotyping of group A rotavirus in two wastewater treatment plants, Iran. *Braz J Microbiol*. 2020; 51:197-203. DOI: [10.1007/s42770-019-00131-0](https://doi.org/10.1007/s42770-019-00131-0)
 27. Choi PM, Tschärke BJ, Donner E, O'Brien JW, Grant SC, Kaserzon SL, *et al*. Wastewater-based epidemiology biomarkers: past, present and future. *Trends Analyt Chem*. 2018; 105:453-69. DOI: [10.1016/j.trac.2018.06.004](https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004)
 28. Alygizakis N, Markou AN, Rousis NI, Galani A, Avgeris M, Adamopoulos PG, *et al*. Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: protocols and future perspectives. *Trends Analyt Chem*. 2021; 134:116125. DOI: [10.1016/j.trac.2020.116125](https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116125)
 29. Frydman C, Miño S, Iglesias NG, Carballeda JM, Simari M, Pisano MB, *et al*. Wastewater surveillance of enteric viruses in eastern Argentina: high rates of detection and first report of NoV GI.5 and GII.20. *Environ Adv*. 2024; 15:100501. DOI: [10.1016/j.envadv.2024.100501](https://doi.org/10.1016/j.envadv.2024.100501)
 30. Raya S, Tandukar S, Kattel HP, Sharma S, Sangsanont J, Sirikanchana K, *et al*. Prevalence of hepatitis A and E viruses in wastewater in Asian countries. *Sci Total Environ*. 2024; 951:175473. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2024.175473](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175473)

31. Ahmed W, Simpson SL, Bertsch PM, Bibby K, Bivins A, Blackall LL, *et al.* Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. *Sci Total Environ.* 2022; 805:149877. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.149877](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149877)
32. Ort C, Lawrence MG, Rieckermann J, Joss A. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol.* 2010; 44:6024-35. DOI: [10.1021/es100779n](https://doi.org/10.1021/es100779n)
33. Angga MS, Malla B, Raya S, Kitajima M, Haramoto E. Optimization and performance evaluation of an automated filtration method for the recovery of SARS-CoV-2 and other viruses in wastewater. *Sci Total Environ.* 2023; 882:163487. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.163487](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163487)
34. Bofill-Mas S, Rusiñol M. Recent trends on methods for the concentration of viruses from water samples. *Curr Opin Environ Sci Health.* 2020; 16:7-13. DOI: [10.1016/j.coesh.2020.01.006](https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.006)
35. Lu D, Huang Z, Luo J, Zhang X, Sha S. Primary concentration - The critical step in implementing the wastewater-based epidemiology for the COVID-19 pandemic: a mini-review. *Sci Total Environ.* 2020; 747:141245. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.141245](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141245)
36. Zhou X, Li Q, Shi Z, Lu W, Shu C, Zhu J, *et al.* Assessing the prevalence of human enteric viruses in hospital wastewater to evaluate the effectiveness of wastewater treatment systems. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2025; 289:117488. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2024.117488](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117488)
37. Manoha C, Dequiedt AL, Thery L, Marotel M, Pez F, Vouillon B, *et al.* Multisite community-scale monitoring of respiratory and enteric viruses in the effluent of a nursing home and in the inlet of the local wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol.* 2024; 90:e0115824. DOI: [10.1128/aem.01158-24](https://doi.org/10.1128/aem.01158-24)
38. Chacón L, Morales E, Valiente C, Reyes L, Barrantes K. Wastewater-based epidemiology of enteric viruses and surveillance of acute gastrointestinal illness outbreaks in a resource-limited region. *Am J Trop Med Hyg.* 2021; 105:1004-12. DOI: [10.4269/ajtmh.21-0050](https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0050)
39. Farkas K, Marshall M, Cooper D, McDonald JE, Malham SK, Peters DE, *et al.* Seasonal and diurnal surveillance of treated and untreated wastewater for human enteric viruses. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25:33391-401. DOI: [10.1007/s11356-018-3261-y](https://doi.org/10.1007/s11356-018-3261-y)
40. Farkas K, Kevill JL, Williams RC, Pântea I, Ridding N, Lambert-Slosarska K, *et al.* Comparative assessment of Nanotrap and polyethylene glycol-based virus concentration in wastewater samples. *FEMS Microbes.* 2024; 5:xtae007. DOI: [10.1093/femsmc/xtae007](https://doi.org/10.1093/femsmc/xtae007)
41. Ibrahim C, Hammami S, Khelifi N, Hassen A. Detection of enteroviruses and SARS-CoV-2 in Tunisian wastewater. *Food Environ Virol.* 2023; 15:224-35. DOI: [10.1007/s12560-023-09557-0](https://doi.org/10.1007/s12560-023-09557-0)
42. Kumthip K, Khamrin P, Ushijima H, Maneekarn N. Detection of six different human enteric viruses contaminating environmental water in Chiang Mai, Thailand. *Microbiol Spectr.* 2023; 11:e0351222. DOI: [10.1128/spectrum.03512-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.03512-22)
43. Ibrahim C, Hammami S, Pothier P, Khelifi N, Hassen A. The performance of biological and tertiary wastewater treatment procedures for rotaviruses A removal. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020; 27:5718-29. DOI: [10.1007/s11356-019-05487-2](https://doi.org/10.1007/s11356-019-05487-2)
44. Thongprachum A, Fujimoto T, Takanashi S, Saito H, Okitsu S, Shimizu H, *et al.* Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infect Genet Evol.* 2018; 63:17-23. DOI: [10.1016/j.meegid.2018.05.006](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.006)
45. Walker DI, Witt J, Rostant W, Burton R, Davison V, Ditchburn J, *et al.* Piloting wastewater-based surveillance of norovirus in England. *Water Res.* 2024; 263:122152. DOI: [10.1016/j.watres.2024.122152](https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122152)
46. Alex-Sanders N, Woodhall N, Farkas K, Scott G, Jones DL, Walker DI. Development and validation of a duplex RT-qPCR assay for norovirus quantification in wastewater samples. *J Virol Methods.* 2023; 321:114804. DOI: [10.1016/j.jviromet.2023.114804](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114804)
47. Girón-Guzmán I, Cuevas-Ferrando E, Barranquero R, Díaz-Reolid A, Puchades-Colera P, Falcó I, *et al.* Urban wastewater-based epidemiology for multi-viral pathogen surveillance in the Valencian region, Spain. *Water Res.* 2024; 255:121463. DOI: [10.1016/j.watres.2024.121463](https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121463)
48. Linden YS, Fagnant-Sperati CS, Kossik AL, Harrison JC, Beck NK, Boyle DS, *et al.* Method development for enteric virus recovery from primary sludge. *Viruses.* 2021; 13:440. DOI: [10.3390/v13030440](https://doi.org/10.3390/v13030440)
49. Saasa N, M'kandawire E, Ndebe J, Mwenda M, Chimpukutu F, Mukubesa AN, *et al.* Detection of human adenovirus and rotavirus in wastewater in Lusaka, Zambia: demonstrating the utility of environmental surveillance for the community. *Pathogens.* 2024; 13:486. DOI: [10.3390/pathogens13060486](https://doi.org/10.3390/pathogens13060486)
50. Rao G, Capone D, Zhu K, Knoble A, Linden Y, Clark R, *et al.* Simultaneous detection and quantification of multiple pathogen targets in wastewater. *PLoS Water.* 2024; 3:e0000224. DOI: [10.1371/journal.pwat.0000224](https://doi.org/10.1371/journal.pwat.0000224)

51. Wang H, Neyvaldt J, Enache L, Sikora P, Mattsson A, Johansson A, *et al.* Variations among viruses in influent water and effluent water at a wastewater plant over one year as assessed by quantitative PCR and metagenomics. *Appl Environ Microbiol.* 2020; 86:e02073-20. DOI: [10.1128/aem.02073-20](https://doi.org/10.1128/aem.02073-20)
52. Wyler E, Lauber C, Manukyan A, Deter A, Quedenau C, Teixeira Alves LG, *et al.* Pathogen dynamics and discovery of novel viruses and enzymes by deep nucleic acid sequencing of wastewater. *Environ Int.* 2024; 190:108875. DOI: [10.1016/j.envint.2024.108875](https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108875)
53. Smith MF, Maqsood R, Sullins RA, Driver EM, Halden RU, Lim ES. Seasonality of respiratory, enteric, and urinary viruses revealed by wastewater genomic surveillance. *mSphere.* 2024; 9:e0010524. DOI: [10.1128/msphere.00105-24](https://doi.org/10.1128/msphere.00105-24)
54. Brinkman NE, Fout GS, Keely SP. Retrospective surveillance of wastewater to examine seasonal dynamics of enterovirus infections. *mSphere.* 2017; 2:e00099-17. DOI: [10.1128/msphere.00099-17](https://doi.org/10.1128/msphere.00099-17)
55. Zhou N, Lin X, Wang S, Tao Z, Xiong P, Wang H, *et al.* Molecular epidemiology of GI and GII noroviruses in sewage: 1-year surveillance in eastern China. *J Appl Microbiol.* 2016; 121:1172-9. DOI: [10.1111/jam.13218](https://doi.org/10.1111/jam.13218)
56. Fagnant CS, Sánchez-Gonzalez LM, Zhou NA, Falman JC, Eisenstein M, Guelig D, *et al.* Improvement of the bag-mediated filtration system for sampling wastewater and wastewater-impacted waters. *Food Environ Virol.* 2018; 10:72-82. DOI: [10.1007/s12560-017-9311-7](https://doi.org/10.1007/s12560-017-9311-7)
57. van Zyl WB, Zhou NA, Wolfaardt M, Matsapola PN, Ngwana FB, Symonds EM, *et al.* Detection of potentially pathogenic enteric viruses in environmental samples from Kenya using the bag-mediated filtration system. *Water Supp.* 2019; 19:1668-76. DOI: [10.2166/ws.2019.046](https://doi.org/10.2166/ws.2019.046)
58. Martin NA, Gonzalez G, Reynolds LJ, Bennett C, Campbell C, Nolan TM, *et al.* Adeno-associated virus 2 and human adenovirus F41 in wastewater during outbreak of severe acute hepatitis in children, Ireland. *Emerg Infect Dis.* 2023; 29:751-60. DOI: [10.3201/eid2904.221878](https://doi.org/10.3201/eid2904.221878)
59. Qiu JY, Mah R, Brand LA, Pang X, Barnett M, Diggle M, *et al.* Impact of sample storage time and temperature on the stability of respiratory viruses and enteric viruses in wastewater. *Microorganisms.* 2024; 12:2459. DOI: [10.3390/microorganisms12122459](https://doi.org/10.3390/microorganisms12122459)
60. Janahi EM, Mustafa S, Parkar SFD, Naser HA, Eisa ZM. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in a sewage treatment center and Shallow Water Bay. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17:6483. DOI: [10.3390/ijerph17186483](https://doi.org/10.3390/ijerph17186483)
61. Wang H, Churqui MP, Tunovic T, Enache L, Johansson A, Lindh M, *et al.* Measures against COVID-19 affected the spread of human enteric viruses in a Swedish community, as found when monitoring wastewater. *Sci Total Environ.* 2023; 895:165012. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.165012](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165012)
62. McCall C, Wu H, O'Brien E, Xagorarakis I. Assessment of enteric viruses during a hepatitis outbreak in Detroit MI using wastewater surveillance and metagenomic analysis. *J Appl Microbiol.* 2021; 131:1539-54. DOI: [10.1111/jam.15027](https://doi.org/10.1111/jam.15027)
63. McCall C, Wu H, Miyani B, Xagorarakis I. Identification of multiple potential viral diseases in a large urban center using wastewater surveillance. *Water Res.* 2020; 184:116160. DOI: [10.1016/j.watres.2020.116160](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116160)
64. Li Y, Miyani B, Faust RA, David RE, Xagorarakis I. A broad wastewater screening and clinical data surveillance for virus-related diseases in the metropolitan Detroit area in Michigan. *Hum Genomics.* 2024; 18:14. DOI: [10.1186/s40246-024-00581-0](https://doi.org/10.1186/s40246-024-00581-0)
65. Ahmed W, Smith WJM, Tiwari A, Bivins A, Simpson SL. Unveiling indicator, enteric, and respiratory viruses in aircraft lavatory wastewater using adsorption-extraction and Nanotrap® microbiome a particles workflow. *Sci Total Environ.* 2023; 896:165007. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.165007](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165007)
66. Nascimento MCA do, Smith WJM, Liu Y, Simpson SL, Bivins A, Rahal P, *et al.* Development and comparative assessment of RT-qPCR and duplex RT-LAMP assays for the monitoring of Aichi Virus A (AiV-A) in untreated wastewater samples. *Sci Total Environ.* 2024; 952:175440. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2024.175440](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175440)
67. Ahmed W, Bivins A, Simpson SL, Smith WJM, Metcalfe S, McMinn B, *et al.* Comparative analysis of rapid concentration methods for the recovery of SARS-CoV-2 and quantification of human enteric viruses and a sewage-associated marker gene in untreated wastewater. *Sci Total Environ.* 2021; 799:149386. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.149386](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149386)
68. Lin X, Zou R, Liu Y, Ji F, Tao Z, Xu A. Continuous detection of norovirus and astrovirus in wastewater in a coastal city of China in 2014-2016. *Lett Appl Microbiol.* 2021; 73:418-25. DOI: [10.1111/lam.13530](https://doi.org/10.1111/lam.13530)
69. Hotta C, Fujinuma Y, Ogawa T, Akita M, Ogawa T. Surveillance of wastewater to monitor the prevalence of gastroenteritis viruses in Chiba prefecture (2014-2019). *J Epidemiol.* 2024; 34:195-202. DOI: [10.2188/jea.je20220305](https://doi.org/10.2188/jea.je20220305)
70. Ando H, Ahmed W, Okabe S, Kitajima M. Tracking the effects of the COVID-19 pandemic on viral gastroenteritis through wastewater-based

- retrospective analyses. *Sci Total Environ.* 2023; 905:166557. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.166557](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166557)
71. Ahmed W, Bivins A, Korajkic A, Metcalfe S, Smith WJM, Simpson SL. Comparative Analysis of Adsorption-Extraction (AE) and Nanotrap® Magnetic Virus Particles (NMVP) workflows for the recovery of endogenous enveloped and non-enveloped viruses in wastewater. *Sci Total Environ.* 2023; 859:160072. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.160072](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160072)
 72. Boehm AB, Shelden B, Duong D, Banaei N, White BJ, Wolfe MK. A retrospective longitudinal study of adenovirus group F, norovirus GI and GII, rotavirus, and enterovirus nucleic acids in wastewater solids at two wastewater treatment plants: solid-liquid partitioning and relation to clinical testing data. *mSphere.* 2024; 9:e00736-23. DOI: [10.1128/msphere.00736-23](https://doi.org/10.1128/msphere.00736-23)
 73. Santiso-Bellón C, Randazzo W, Pérez-Cataluña A, Vila-Vicent S, Gozalbo-Rovira R, Muñoz C, *et al.* Epidemiological surveillance of Norovirus and Rotavirus in sewage (2016-2017) in Valencia (Spain). *Microorganisms.* 2020; 8:458. DOI: [10.3390/microorganisms8030458](https://doi.org/10.3390/microorganisms8030458)
 74. Plaza-Garrido A, Ampuero M, Gaggero A, Villamar-Ayala CA. Norovirus, hepatitis A and SARS-CoV-2 surveillance within Chilean rural wastewater treatment plants based on different biological treatment typologies. *Sci Total Environ.* 2023; 863:160685. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.160685](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160685)
 75. Belgasmi H, Miles SJ, Sayyad L, Wong K, Harrington C, Gerloff N, *et al.* CaFÉ: a sensitive, low-cost filtration method for detecting polioviruses and other enteroviruses in residual waters. *Front Environ Sci.* 2022; 10:914387. DOI: [10.3389/fenvs.2022.914387](https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.914387)
 76. Barbosa C, Nogueira S, Gadanho M, Chaves S. Chapter 7. DNA extraction: finding the most suitable method. In: Cook N, D'Agostino M, Thompson KC (Eds). *Molecular microbial diagnostic methods. Pathways to implementation for the food and water industry.* Amsterdam, Netherlands:Elsevier; 2016. pp. 135-54. DOI: [10.1016/B978-0-12-416999-9.00007-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416999-9.00007-1)
 77. Corpuz MVA, Buonerba A, Vigliotta G, Zarra T, Ballesteros F Jr, Campiglia P, *et al.* Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Sci Total Environ.* 2020; 745:140910. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.140910](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910)
 78. Stobnicka-Kupiec A, Gołofit-Szymczak M, Cyprowski M, Górny RL. Detection and identification of potentially infectious gastrointestinal and respiratory viruses at workplaces of wastewater treatment plants with viability qPCR/RT-qPCR. *Sci Rep.* 2022; 12:4517. DOI: [10.1038/s41598-022-08452-1](https://doi.org/10.1038/s41598-022-08452-1)
 79. Cuevas-Ferrando E, Pérez-Cataluña A, Falcó I, Randazzo W, Sánchez G. Monitoring Human viral pathogens reveals potential hazard for treated wastewater discharge or reuse. *Front Microbiol.* 2022; 13:836193. DOI: [10.3389/fmicb.2022.836193](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.836193)
 80. Bianconi I, Aschbacher R, Pagani E. Current uses and future perspectives of genomic technologies in clinical microbiology. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12:1580. DOI: [10.3390/antibiotics12111580](https://doi.org/10.3390/antibiotics12111580)
 81. Mackuľák T, Gál M, Špalková V, Fehér M, Briestenská K, Mikušová M, *et al.* Wastewater-based epidemiology as an early warning system for the spreading of SARS-CoV-2 and its mutations in the population. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 18:5629. DOI: [10.3390/ijerph18115629](https://doi.org/10.3390/ijerph18115629)
 82. Carlson KB, Dilley A, O'Grady T, Johnson JA, Lopman B, Viscidi E. A narrative review of norovirus epidemiology, biology, and challenges to vaccine development. *NPJ Vaccines.* 2024; 9:94. DOI: [10.1038/s41541-024-00884-2](https://doi.org/10.1038/s41541-024-00884-2)
 83. Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global impact of Rotavirus vaccination on diarrhea hospitalizations and deaths among children <5 years old: 2006-2019. *J Infect Dis.* 2020; 222:1731-9. DOI: [10.1093/infdis/jiaa081](https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa081)
 84. World Health Organization. Viral pathogens. Adenoviruses. In: *Guidelines for drinking-water quality.* 4th ed. Incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization; 2017. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf>

