

ARTÍCULO - Tesis Premiadas Convocatoria de Premios RADE 2025

PRESENCIA, ESTABILIDAD Y CIRCULACIÓN AMBIENTAL DE PATÓGENOS VIRALES EN EL CICLO DEL AGUA URBANO

Viral pathogens in water: occurrence, fate and environmental circulation

Inés Girón Guzmán^{*,**}, Irene Falcó^{**}, Alba Pérez-Cataluña^{**}, Gloria Sánchez^{**}
inesgironguzman@gmail.com

RESUMEN

El agua puede actuar como vehículo de transmisión de contaminantes biológicos, incluidos virus, suponiendo un riesgo para la salud pública. Al mismo tiempo, la presencia de los virus en aguas residuales proporciona información epidemiológica valiosa, dando lugar a la epidemiología basada en aguas residuales (WBE), una herramienta epidemiológica rápida y no invasiva.

En esta tesis se aplicó la WBE para la vigilancia de virus entéricos, SARS-CoV-2, virus de la influenza A y virus respiratorio sincitial mediante RT-qPCR y secuenciación masiva, demostrando ser eficaces para analizar la prevalencia viral y confirmando el potencial de esta herramienta como sistema de alerta temprana. Este enfoque también se aplicó para la vigilancia del virus de la viruela del mono durante el brote en España en 2022.

Se compararon métodos de concentración viral, con el objetivo de mejorar la sensibilidad de detección. Por otra parte, los análisis en plantas de tratamiento mostraron la presencia de virus en agua regenerada y biosólidos, evidenciando limitaciones en su eliminación. Por último, los estudios de estabilidad indicaron que los virus pueden permanecer infecciosos en el agua dependiendo de las condiciones ambientales, lo que subraya la necesidad de mejorar las estrategias de tratamiento y control para reducir riesgos en la salud pública y ambiental.

PALABRAS CLAVE: Virus entéricos, virus respiratorios, virus emergentes, ciclo urbano del agua, distribución viral, estabilidad viral.

ABSTRACT

Water can act as a vehicle for the transmission of biological contaminants, including viruses, posing a risk to public health. At the same time, the presence of viruses in wastewater provides valuable epidemiological information, giving rise to wastewater-based epidemiology (WBE), a rapid and non-invasive epidemiological tool.

In this thesis, WBE was applied for the surveillance of enteric viruses, SARS-CoV-2, influenza A virus and respiratory syncytial virus using RT-qPCR and high-throughput sequencing, demonstrating their effectiveness for analyzing viral prevalence and confirming the potential of this approach as an early warning system. This strategy was also applied to monitor monkeypox virus during the 2022 outbreak in Spain.

Viral concentration methods were compared in order to improve detection sensitivity. In addition, analyses conducted in wastewater treatment plants revealed the presence of viruses in reclaimed water and biosolids, highlighting limitations in their removal. Finally, viral stability studies indicated that viruses may remain infectious in water depending on environmental conditions, underscoring the need to improve treatment and monitoring strategies to reduce risks to public and environmental health.

KEYWORDS: Enteric viruses, respiratory viruses, emerging viruses, urban water cycle, viral distribution, viral stability.

* La autora fue galardonada con el Premio RADE Ciencias de la Vida y de la Salud en la Convocatoria de Premios a la Investigación Real Academia de Doctores de España 2025 a la mejor tesis doctoral por su tesis *Patógenos virales en el agua: presencia, estabilidad y circulación ambiental*.

** VISAFELab. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, Valencia.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso esencial para la vida, presente en nuestra alimentación y en actividades como el uso doméstico, la agricultura, la acuicultura, la preparación de alimentos y la industria (Linderhof *et al.*, 2021). Por lo tanto, resulta crucial garantizar que su abastecimiento sea suficiente, seguro y accesible para toda la población. Sin embargo, el agua también puede actuar como vehículo en la diseminación de microorganismos patógenos, incluidos virus entéricos como los norovirus humano (HuNoV) o el virus de la hepatitis A (HAV), que pueden entrar en la cadena alimentaria contaminando instalaciones, envases y el propio alimento (Bosch *et al.*, 2008; Kirby *et al.*, 2003; Oude Munnink and van der Hoek, 2016; WHO and FAO, 2008). En agricultura, los virus entéricos pueden llegar a los alimentos a través del riego con agua contaminada o mediante el uso de lodos de depuradora como fertilizantes (Mantovi *et al.*, 2005). Ambas fuentes de posible contaminación se generan en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) (WHO and FAO, 2008). En acuicultura, si el agua utilizada para cultivar y cosechar moluscos bivalvos está contaminada, representa un riesgo significativo para la salud de los consumidores debido a la naturaleza filtradora de estos animales (bioacumulación) y a los escasos procesos de cocción que reciben antes de su consumo (Bosch *et al.*, 2008).

El agua representa un papel muy importante en la diseminación de los virus entéricos, cuya principal ruta de transmisión es la ruta fecal-oral, y el riesgo que implica la presencia de estos microorganismos en ella se ha demostrado ampliamente (Bosch *et al.*, 2008; Oude Munnink and van der Hoek, 2016; UN-Water, 2021). Sin embargo, en los últimos años, se ha observado que los virus respiratorios, los cuales también se excretan en las heces y otros fluidos de humanos y animales infectados, pueden detectarse y propagarse a través del agua (Boehm *et al.*, 2023). La posibilidad de transmisión de estos virus a través de esta vía es un tema controvertido y continúa siendo objeto de estudio en la actualidad. Además, debido al contacto que las masas de agua tienen con humanos y animales, se ha observado que el agua para actuar como vehículo de diseminación de virus con potencial zoonótico, lo que representa un riesgo significativo para la salud (Blagodatski *et al.*, 2021; Christou and Kosmidou, 2013; Velkers *et al.*, 2017; WHO and FAO, 2008). De hecho, la interacción entre humanos, animales y el medio ambiente ha cobrado mayor relevancia en los últimos años, evidenciando la necesidad de estudiar los patógenos considerando estos tres pilares básicos, enfoque conocido como “Una sola salud” (Awad *et al.*, 2024; Lefrançois *et al.*, 2023; WHO, 2023). Además del papel del agua en la transmisión de patógenos, otro aspecto a considerar es la capacidad de los virus de permanecer infecciosos en ella. La estabilidad de los virus depende de varios factores, como el tipo de virus, la matriz, la temperatura, el tiempo y el pH (Mehle *et al.*, 2018).

El ciclo natural del agua es un proceso fundamental en la naturaleza, en el que todos los cuerpos de agua implicados, ya sean superficiales como ríos, lagos y mares, o subterráneos, o incluso el hielo, están interconectados y son susceptibles a la contaminación por virus (Pinon and Vialette, 2019). Esta contaminación puede originarse por diversas fuentes, incluidas descargas industriales, agrícolas y urbanas, así como por una gestión inadecuada de residuos, afectando a humanos, animales y al medio ambiente. Entre estas fuentes, el ciclo urbano del agua destaca por su relevancia, desempeñando un papel clave desde la perspectiva de la calidad y la seguridad hídrica. Este ciclo urbano incluye varias etapas, desde la captación de agua utilizada por parte de diferentes núcleos de población e industrias, hasta su tratamiento en EDARs para la eliminación de contaminantes (Mehle *et al.*, 2018). La calidad de los efluentes y lodos generados en estas plantas de tratamiento es crucial, ya que puede afectar directamente a la salud pública y al medio ambiente. Los lodos generados durante el tratamiento de estas aguas residuales pueden ser utilizados como fertilizante en agricultura mientras que el agua tratada puede ser utilizada para riego agrícola y fines industriales, o recircularse a diferentes cuerpos de agua, como ríos y lagos (Amores *et al.*, 2013; Mantovi *et al.*, 2005). Desde estos puntos se capta agua para las estaciones de tratamiento de agua potable (ETAPs), donde se lleva a cabo su potabilización y distribución a la población. Después de su uso, el agua se convierte en agua residual y regresa de nuevo a las EDARs para continuar el ciclo urbano del agua. Como resultado, una gestión inadecuada de las aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas implica potenciales riesgos medioambientales y de salud.

Por otro lado, la escasez de agua y las sequías ejercen una presión adicional sobre los recursos hídricos globales, una situación que empeorará en los próximos años debido al cambio climático y al crecimiento de la población (Shevah, 2015; UN-Water, 2021). En respuesta a estos desafíos, se están fomentando políticas de reutilización del agua, que implica la utilización de efluentes de EDARs para usos no potables como industria y riego agrícola. Esta estrategia ayuda a reducir la demanda de agua de fuentes naturales como, por ejemplo, ríos y lagos (Voulvoulis, 2018). Si bien las aguas residuales y lodos son utilizados globalmente, una parte significativa se emplea de manera no controlada y/o sin tratamiento adecuado, careciendo de controles suficientes para salvaguardar la salud humana y ambiental (Corpuz *et al.*, 2020; Mateo-Sagasta *et al.*, 2015). Cuando se maneja correctamente, siguiendo parámetros como los definidos en el Reglamento (UE) 2020/741, la utilización de efluentes de EDARs y lodos puede generar numerosas ventajas, como una producción de alimentos más segura, una mayor resiliencia a la escasez de agua y nutrientes y una economía circular mejorada (EC, 2020; Regitano *et al.*, 2022). La eficacia de las plantas de tratamiento de aguas se evalúa mediante la reducción de contaminantes en los efluentes, por lo que resulta fundamental desarrollar métodos eficientes para la detección de virus en el agua.

La detección de virus en aguas generalmente requiere de una etapa previa de concentración, debido a los bajos niveles de estos patógenos y a las técnicas empleadas para su detección (Farkas *et al.*, 2022. Tradicionalmente, los métodos de concentración se basan en precipitación, adsorción, filtración, ultrafiltración y ultracentrifugación (Cuevas-Ferrando *et al.*, 2020; Farkas *et al.*, 2022; Pérez-Cataluña *et al.*, 2021). Mientras que la detección y cuantificación de virus se ha basado en métodos de cultivo celular, pero estos presentan importantes limitaciones en muestras ambientales, como la presencia de múltiples virus, la falta de líneas celulares adecuadas, la baja concentración viral y la toxicidad de las aguas (Gerba *et al.*, 2018; Lodder *et al.*, 2010). No obstante, estos métodos se han aplicado con éxito a algunos virus, y se han desarrollado técnicas combinadas, como la PCR con cultivo celular integrado o ICC-RT-qPCR, que permiten reducir el tiempo de análisis (Abad *et al.*, 1997). Más recientemente, los enteroides intestinales humanos (HIE) han surgido como modelos más realistas para estudiar virus entéricos (Carmona-Vicente *et al.*, 2024; Desdouits *et al.*, 2022; Kennedy *et al.*, 2023; Shaffer *et al.*, 2022). Dadas las limitaciones del cultivo celular, considerado el estándar para medir infectividad, la detección de virus se ha basado principalmente en métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), muy sensibles y específicos pero no proporcionan información sobre la infectividad (Corpuz *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2009). Para superar esta limitación, se han desarrollado métodos indirectos, como ensayos de unión a receptores (por ejemplo, con mucina gástrica porcina) (Tian *et al.*, 2005) y enfoques basados en la integridad de la cápside viral. Estos últimos utilizan compuestos como el propidio monoazida (PMA) o tetracloruro de platino (PtCl₄), que bloquean la detección de virus dañados mediante su unión al material genético, permitiendo estimar su infectividad (Canh *et al.*, 2019; Randazzo *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2012).

A pesar de que las aguas residuales no tratadas o tratadas inadecuadamente son la fuente principal de la propagación de microorganismos patógenos en el ambiente, la presencia y detección de virus en aguas residuales también puede suponer una oportunidad, como es la epidemiología basada en las aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés Wastewater-Based Epidemiology). La epidemiología se define como el estudio de la incidencia, distribución y control de las enfermedades en las poblaciones (Frérot *et al.*, 2018). Existen varias herramientas que se basan en sistemas de monitorización pasivos, sin embargo, pueden presentar dificultades prácticas y económicas, como la limitación de las pruebas clínicas únicamente a pacientes sintomáticos, la falta de recursos y atención médica en determinados países, o la sobrecarga de las capacidades analíticas en epidemias graves y pandemias (Polo *et al.*, 2020; Sims and Kasprzyk-Hordern, 2020). Todos estos factores contribuyen a la estimación potencialmente inexacta de la propagación de las enfermedades, lo que hace necesario el desarrollo de nuevos enfoques. Estas herramientas novedosas de vigilancia han de ser flexibles, económicas, escalables y capaces de proporcionar datos

objetivos y completos en tiempo real para complementar las debilidades de los enfoques tradicionales. La WBE es una herramienta que proporciona, mediante el análisis de agentes excretados en heces, orina y otros fluidos que van a parar a las aguas residuales, evaluaciones en tiempo real, completas y objetivas del estado de salud pública y ambiental, con el fin de obtener información sobre la circulación de diferentes agentes en la población, el estado de salud de la comunidad y los factores de riesgo asociados con el agente elegido, independientemente de los sesgos causados por factores socioeconómicos o la falta de síntomas en la población afectada (Mao *et al.*, 2020; WHO, 2020).

Desde el origen de la WBE en el siglo XIX, donde se vincularon los casos de cólera ocurridos en Londres con el agua contaminada utilizada para beber y fines domésticos (Cerdeira and Valdivia, 2007), se han detectado diferentes contaminantes que podrían estar circulando en la comunidad: desde productos químicos, como drogas, pesticidas, hormonas y medicamentos, hasta microorganismos patógenos, como bacterias y virus (Sims and Kasprzyk-Hordern, 2020). En los últimos años, la variedad de patógenos que pueden detectarse se ha ampliado y los virus han adquirido cada vez más importancia. Por ejemplo, la WBE se utiliza en el programa de erradicación de la poliomielitis de la Organización Mundial de la Salud, o para la detección de otros virus entéricos como el HAV y el virus de la hepatitis E (HEV), HuNoV, enterovirus, y rotavirus (RV) (Benschop *et al.*, 2017; Chacón *et al.*, 2021; Cuevas-Ferrando *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2022; McCall *et al.*, 2021). Además, durante la pandemia de la enfermedad producida por coronavirus (COVID-19, del inglés Coronavirus Disease), la detección del coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo (SARS-CoV-2, del inglés Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2) ha demostrado ser una estrategia eficaz de alerta temprana del virus y sus variantes, así como para detectar cambios en su incidencia. El principio detrás de esta herramienta es el hecho de que los individuos infectados pueden excretar los virus en las heces antes de desarrollar síntomas y, por lo tanto, antes de buscar atención médica. Un pico de incidencia o nuevas variantes de un agente infeccioso pueden detectarse antes con WBE que con estrategias epidemiológicas tradicionales (Olesen *et al.*, 2021; Pérez-Cataluña *et al.*, 2022; Randazzo *et al.*, 2020).

A pesar del auge de la WBE en los últimos años, todavía no existen métodos estandarizados y validados para virus, y la aparición de nuevos métodos de concentración hacen necesario ampliar los estudios comparativos sobre estas técnicas (Barril *et al.*, 2021; Farkas *et al.*, 2022). Con respecto a la detección, el desarrollo e implementación de métodos moleculares, como la PCR, la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), la PCR cuantitativa (qPCR) y la PCR digital (ddPCR), el número de procedimientos y virus analizados en aguas ha crecido exponencialmente (Farkas *et al.*, 2020). Por otra parte, las técnicas de secuenciación masiva han demostrado ser una herramienta muy útil para evaluar fluctuaciones temporales y diversidad de virus en muestras de aguas residuales, así como para detectar cambios en su

evolución y la aparición de nuevas cepas virales. La mayoría de las técnicas específicas de PCR no pueden discriminar entre la amplia variedad de linajes circulantes porque solamente pueden detectar una o unas pocas mutaciones de un mismo virus. Mientras que las nuevas variantes de virus pueden detectarse y cuantificarse utilizando técnicas cuantitativas como PCR/RT-PCR (qPCR/RT-qPCR) simples y dúplex, el uso de técnicas de secuenciación ha demostrado ser clave para la monitorización de variantes, linajes y sublinajes en aguas residuales durante la COVID-19 (Crits-Christoph *et al.*, 2021; Nemudryi *et al.*, 2020; Pérez-Cataluña *et al.*, 2022)

Para un enfoque integral de WBE, la fase final del proceso incluye la interpretación de los datos relacionando la dinámica de las aguas residuales, la relación espacio-temporal con la población y los datos clínicos reportados en el área estudiada. De esta forma, se han demostrado numerosas correlaciones entre los datos de WBE y la incidencia y el número de hospitalizaciones de pacientes en múltiples entornos (Acosta *et al.*, 2021; Galani *et al.*, 2022; Schenk *et al.*, 2023). La vigilancia de virus entéricos, respiratorios y emergentes a través de la WBE es una estrategia muy útil para comprender mejor la aparición y la dinámica de estos patógenos en una población a través del estudio del agua. Sin embargo, un aspecto importante a tener en cuenta es que los niveles detectados de virus en aguas residuales pueden verse afectados por factores independientes del tratamiento de la muestra en el laboratorio. Restricciones de movilidad y cuarentenas, el turismo y festividades, o el efecto de dilución por la lluvia, pueden afectar a la concentración estimada en este tipo de estudios (Olesen *et al.*, 2021; Sims and Kasprzyk-Hordern, 2020). La normalización de datos permite comparaciones entre diferentes muestras de la misma EDAR a lo largo del tiempo, o incluso entre diferentes poblaciones. Esta estrategia se lleva a cabo normalizando los datos con parámetros físico-químicos del agua o algunos virus como el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV, de sus siglas en inglés Pepper Mild Mottle virus) o el bacteriófago crAssphage, conocidos por ser indicadores de presencia de contaminación fecal humana (CDC, 2023; EC, 2021; Hsu *et al.*, 2022; Markt *et al.*, 2023).

En este contexto, el objetivo principal de la tesis fue detectar y caracterizar patógenos virales presentes en aguas mediante el uso combinado de métodos moleculares y de cultivo celular, con el fin de comprender mejor su dinámica y comportamiento en el medio acuático. Para ello, se plantearon como objetivos específicos: aplicar la epidemiología basada en aguas residuales como herramienta para detectar virus que circulan en la población; comparar y optimizar diferentes métodos para la concentración y detección de patógenos virales en agua; identificar la presencia de virus en distintas etapas del ciclo urbano del agua y evaluar la eficacia de las plantas de tratamiento y estudiar la estabilidad de los virus en agua mediante cultivo celular y PCR de viabilidad.

2. CAPÍTULOS DE LA TESIS

2.1. Epidemiología basada en aguas residuales urbanas para la vigilancia de patógenos virales en Valencia, España

Durante la pandemia causada por el SARS-CoV-2, la WBE experimentó un auge a nivel mundial, demostrando su capacidad como herramienta epidemiológica de alerta temprana, incluso posibilitando la detección de nuevas variantes introducidas en la población. En la Comunidad Valenciana, esta herramienta fue ampliamente utilizada, sin embargo, no se disponía de estudios que demostrasen la utilidad de la WBE para el control epidemiológico de otros virus patógenos de humanos. Por ello, en el marco de la tesis, se evaluó la prevalencia y los patrones temporales de diferentes virus entéricos, respiratorios e indicadores virales de contaminación fecal en aguas residuales de nuestra región. Para ello, semanalmente se recogieron muestras de agua residual a la entrada de una EDAR urbana de la provincia de Valencia, desde octubre de 2021 hasta febrero de 2023. Las muestras se transportaron al laboratorio, y se concentraron mediante el método de precipitación con cloruro de aluminio (AP) previamente validado por el grupo (Randazzo *et al.*, 2020). La extracción del material genético se llevó a cabo de manera automatizada utilizando el equipo Maxwell® RSC (Promega, España), y la detección de diferentes virus se realizó mediante RT-qPCR, mientras que el indicador crAssphage se analizó mediante qPCR. De esta manera, se detectaron y cuantificaron virus entéricos (HuNoV genogrupo 1 (GI) y GII, astrovirus humano (HAsV), RV, HAV y HEV), virus respiratorios (SARS-CoV-2, virus de la influenza A (IAV) y virus respiratorio sincitial (RSV)) y virus indicadores (crAssphage y PMMoV). En paralelo, se realizó la detección de colifagos somáticos, como tercer tipo de virus indicador, mediante la técnica de recuento en placa basado en la ISO 10705-2 (UNE-EN ISO, 2002). Para la detección y cuantificación de SARS-CoV-2 se utilizó la región del gen de la fosfoproteína de la nucleocápside (N1) como diana. También se evaluó la evolución del SARS-CoV-2 durante el periodo estudiado detectando sus variantes mediante RT-qPCR dúplex y secuenciación masiva. Para la detección mediante RT-qPCR de las variantes de preocupación (VoCs, por sus siglas en inglés Variants of Concern), se utilizaron cinco reacciones dúplex diferentes, revelando así la prevalencia de las variantes Alpha (S:69/70del), Delta (S:157/158del), Omicron BA.1 (S:214insEPE, S:69/70del) y Omicron BA.2 (S:25/27del). Para la secuenciación, se seleccionó una muestra mensual y se utilizaron los esquemas de cebadores Artic v3 (octubre 2021-enero 2022) y Artic v4 (febrero 2022-febrero 2023) para la amplificación de la región que codifica para la espícula y se realizó la secuenciación utilizando el sistema de nanoporos MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies). Las lecturas obtenidas se analizaron con el software Freyja. Finalmente, la evaluación de la prevalencia y los patrones temporales de los virus humanos entéricos y respiratorios en muestras de aguas residuales, así como la identificación de VOCs del SARS-

CoV-2, permitió explorar la correlación de nuestros hallazgos con los registros de salud pública, evaluando también diversos indicadores para la normalización de datos.

Los resultados obtenidos sobre la prevalencia de virus entéricos en aguas residuales están en línea con la literatura existente, mostrando una prevalencia de aproximadamente el 100 % para RV, HAstV y HuNoV GI y GII, mientras que la prevalencia de HAV y HEV fueron de 3,77% y 22,64%, respectivamente. Las concentraciones medias se situaron entre 7,95 y 3,05 log cg/L, siendo estos valores los correspondientes a RV y HAV, respectivamente. En cuanto a los virus respiratorios, SARS-CoV-2 se detectó en el 100% de las muestras de aguas residuales analizadas, mientras que IAV y RSV únicamente se detectaron en el 39,13% y el 31,88% de las muestras, respectivamente. Las concentraciones de estos virus fueron de 5,46 log cg/L para SARS-COV-2, 6,42 log cg/L para IAV y 3,88 log cg/L para RSV.

A pesar de la estacionalidad reportada en las infecciones causadas por algunos virus entéricos, en este estudio no se observó una estacionalidad marcada para ninguno de los virus entéricos estudiados, salvo un ligero aumento durante los meses de invierno en el caso de RV. En el caso de los virus respiratorios, RSV mostró un incremento en invierno, mientras que en el caso de IAV este incremento invernal fue moderado, siendo mucho mayor el pico en incidencia observado durante los meses de primavera. Los resultados de concentración de SARS-CoV-2 en aguas residuales mostraron un aumento coincidiendo con la aparición de nuevas variantes, las cuales alineaban con un incremento en la incidencia poblacional. La comparación de los resultados obtenidos mediante RT-qPCR dúplex para las variantes de SARS-CoV-2 y la secuenciación del genoma mostró que los ensayos de RT-qPCR dúplex lograron resultados significativamente más rápidos, manteniendo la sensibilidad y especificidad adecuada. Aunque la detección de nuevas variantes de SARS-CoV-2 en aguas residuales mediante métodos de secuenciación generalmente necesita concentraciones más altas de partículas virales que los métodos basados en PCR, la identificación de variantes se realizó de manera eficiente incluso en muestras con concentraciones bajas. Cabe destacar que ambas técnicas, RT-qPCR dúplex y la secuenciación, mostraron de forma fiable que la transición de la variante Delta a Omicron ocurrió muy rápidamente, en tan sólo dos semanas, durante diciembre de 2021.

La correlación con datos clínicos es otro componente clave de la WBE, ya que se debe establecer la relación entre las concentraciones virales medidas en aguas residuales y los casos clínicos reportados de la enfermedad. En esta tesis doctoral se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre los casos clínicos confirmados y los datos de cuantificación correspondientes en las aguas residuales para IAV y RSV, lo que demostró el valor de la vigilancia de aguas residuales para monitorizar enfermedades infecciosas en la población. Las correlaciones sin factor de normalización más robustas se produjeron entre la concentración de virus y el número de casos clínicos la semana

posterior a la toma de muestra para SARS-CoV-2 e IAV, y en la misma semana de muestreo en el caso de RSV. Sin embargo, en el caso de los datos clínicos para SARS-CoV-2, éstos dejaron de reportarse a partir de abril de 2022, por lo que estas correlaciones se realizaron con los datos anteriores a esa fecha, ya que fueron los que mejores valores mostraron. Una vez normalizados los datos con diferentes parámetros microbiológicos y físico-químicos, se observó que las correlaciones eran más fuertes cuando se tomaba el número de casos clínicos de la semana posterior al muestreo junto con el caudal de entrada (m³/día) a la EDAR, salvo en el caso de RSV en el que los casos clínicos en la tercera semana desde el muestreo presentaron una correlación más robusta. Además, se calculó el número mínimo de casos clínicos de IAV y RSV para obtener muestras positivas de agua residual, resultando en entre 110 y 205 casos clínicos para IAV y entre 40 y 120 para RSV. Cuando los casos clínicos de IAV y RSV superaban 205 y 210 casos, respetivamente, el 100% de las muestras de agua residual resultaban positivas para estos virus. Este trabajo está recogido en el artículo *Urban wastewater-based epidemiology for multi-viral pathogen surveillance in the Valencian region, Spain* (Girón-Guzmán et al., 2024a).

2.2. Epidemiología basada en aguas residuales para el estudio del virus de la viruela del mono en España

En el capítulo anterior se propone la WBE como una herramienta útil y valiosa para la vigilancia de virus en la población. En mayo de 2022 surgió una nueva oportunidad para demostrar la validez de esta estrategia, debido a un brote de mpox (también conocido como viruela del mono) causado por el virus de la viruela del mono (MPXV). Este brote se produjo en áreas no endémicas, llegando a países como España, entre otros (Orviz et al., 2022). El virus se transmite principalmente a través del contacto con las lesiones dérmicas de personas infectadas, con gotas de secreciones respiratorias y fómites, pero también se ha observado que puede excretarse en fluidos corporales como orina, semen y heces (Hernaiz et al., 2023; Peiro-Mestres et al., 2022). Por ello, se decidió estudiar este virus a través del análisis de aguas residuales mediante las técnicas empleadas para el análisis de SARS-CoV-2 utilizadas de forma rutinaria en la red de vigilancia de aguas residuales en España (VATAR-COVID). Inicialmente, se validó el procedimiento de concentración AP, inoculando una cepa de MPXV inactivada en aguas residuales negativas para el virus. Los resultados mostraron que mediante este procedimiento se obtenían recuperaciones medias del MPXV del 31,5% ± 15,9%, demostrando la validez del método para el estudio de este patógeno. Tras estos ensayos, se analizaron 312 muestras de 24 EDARs distribuidas por el territorio español entre el 9 de mayo y el 4 de agosto de 2022. Las partículas virales se concentraron utilizando el método AP, seguido de la extracción de ácidos nucleicos de forma automatizada utilizando partículas paramagnéticas. Seguidamente, se detectó y cuantificó el ADN de MPXV mediante qPCR. El material genético de este virus se detectó en 56 muestras de aguas residuales (17,9%) con valores que oscilaron entre 3,35 y 4,94 log cg/L.

La primera detección de MPXV en agua residual fue en una EDAR de Madrid durante la semana 20 de 2022, coincidiendo con los primeros casos sospechosos reportados en la ciudad. Posteriormente, se detectó el ADN de MPXV en otras áreas como Gran Canaria y Barcelona. La detección en aguas residuales aumentó progresivamente, alcanzando el 40% de las EDARS analizadas durante la última semana de junio de 2022 (semana 26), cuando en España se habían diagnosticado 130 casos.

El estudio demostró que el ADN de MPXV puede ser detectado mediante qPCR en muestras de aguas residuales, lo que refuerza la utilidad de la WBE como una herramienta no invasiva para el monitoreo de enfermedades emergentes. A pesar de que no se observó una anticipación a la aparición de casos clínicos de mpox similar a la observada para SARS-CoV-2 en otros estudios, la detección de ADN de MPXV en aguas residuales en regiones con bajo número de casos diagnosticados subraya la capacidad de la WBE para reflejar la circulación comunitaria del virus. Además, esta detección de MPXV en regiones con baja prevalencia clínica sugiere que podría haber un mayor número de personas afectadas en comparación a lo que indican los casos clínicos reportados. Por lo tanto, se puede concluir que la detección del ADN de MPXV en aguas residuales y su correlación con los datos clínicos reportados durante el brote del 2022 demuestran que la WBE es una estrategia rápida, sensible y rentable para la vigilancia de amenazas virales emergentes. En situaciones donde el estigma y la discriminación pueden limitar la capacidad de respuesta efectiva durante los brotes, la WBE representa una herramienta valiosa para la monitorización de riesgos relevantes para la salud pública. Los resultados y datos descritos están publicados en el artículo *Spanish wastewater reveals the current spread of Monkeypox virus* (Girón-Guzmán et al., 2023b).

2.3. Evaluación de dos métodos de concentración de aguas residuales para su aplicación en la vigilancia de virus humanos. Efectos en la viabilidad de virus entéricos y en la secuenciación de SARS-CoV-2

Teniendo en cuenta el potencial de la WBE y la capacidad de respuesta a nuevos brotes, se realizó un estudio para evaluar y comparar nuevos métodos de concentración de virus en aguas residuales, no sólo para mejorar la detección y cuantificación viral, sino también para caracterizarlos mediante técnicas de secuenciación masiva y cultivo celular. Para tal fin, se evaluó la eficacia de dos métodos de concentración, la precipitación con cloruro de aluminio (AP), ampliamente utilizada, y un sistema comercial de captura directa (TNA) (Promega, España) frente a diversos virus entéricos (HuNoV GI, HuNoV GII, HAstrV, RV y HEV), indicadores virales (PMMoV y crAssphage) y SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR/qPCR, así como el impacto de las metodologías en la secuenciación de SARS-CoV-2.

Para ello, se escogieron 6 muestras de agua de entrada de EDAR y se inocularon con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y mengovirus (MgV), como controles de proceso

para virus envueltos y no envueltos, respectivamente. Las muestras se concentraron en paralelo con los métodos AP (200 mL) y TNA (40 mL). La extracción del material genético de los concentrados de ambos métodos se llevó a cabo utilizando la purificación automatizada y se realizó la detección del ADN o ARN mediante qPCR o RT-qPCR, respectivamente. Para evaluar la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR se compararon diferentes protocolos que tenían como diana la región N1 y una región del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (IP4). Además de evaluar el nuevo sistema de concentración, también se evaluó la eficacia de un kit de RT-qPCR dúplex para la detección de SARS-CoV-2, que implicaba la detección conjunta de la diana N1 junto con la detección del PMMoV.

Paralelamente, se evaluó el efecto del método de concentración en la secuenciación de SARS-CoV-2 utilizando los cebadores de las versiones 3 y 4 del protocolo de amplificación ARTIC (Artic v3 y Artic v4) mediante la plataforma Illumina MiSeq (Pérez-Cataluña *et al.*, 2022). Además, dadas las limitaciones que presentan las técnicas moleculares para diferenciar la infectividad de los virus, ésta se evaluó mediante técnicas de cultivo celular tras la concentración con los métodos evaluados. Con este objetivo, se escogió el norovirus murino (MNV) como modelo de los HuNoV, y la cepa HM-175 de HAV, utilizando las líneas celulares RAW 264.7 y FRhK-4, respectivamente. A partir de los concentrados obtenidos con los procedimientos AP y TNA, se infectaron los cultivos celulares y se cuantificaron los niveles de virus infecciosos determinando la concentración (TCID₅₀/mL) mediante el método Spearman-Kärber (Falcó *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos mediante RT-qPCR indicaron que el método TNA permitió detectar SARS-CoV-2 con una efectividad del 100% en todas las regiones genómicas utilizadas como dianas. Este rendimiento superó significativamente al método AP, el cual mostró mayor variabilidad en la detección, con porcentajes que oscilaron entre el 33,3% y el 100%, dependiendo de la región del genoma analizada. En cuanto a los niveles de concentración viral, se observaron diferencias estadísticamente significativas para la diana IP4 en muestras concentradas mediante AP, así como para el ensayo dúplex N1-PMMoV utilizando el método TNA.

Para HuNoV GI, HuNoV GII, HEV y PMMoV, el método TNA obtuvo valores medios de concentración superiores a los obtenidos con el método AP. Además, los porcentajes de muestras positivas mediante el método TNA también fueron superiores para HAstV (66%) y HEV (100%) en comparación con los observados con AP (50%). En el caso de los virus indicadores y RV, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) al comparar ambos métodos. Sin embargo, en los virus utilizados como controles de proceso, el porcentaje de recuperación de PEDV fue mayor utilizando el método AP, mientras que la recuperación de MgV fue superior con el método TNA. En cuanto a la secuenciación de SARS-

CoV-2, el método TNA combinado con el esquema de cebadores Artic v4, aunque generó una mayor variabilidad en los resultados, produjo un mayor porcentaje de secuencias virales, así como una mayor profundidad de secuenciación y cobertura del genoma de SARS-CoV-2.

Por último, el estudio abordó cómo los métodos TNA y AP influyen en la infectividad de los virus. Aunque el método TNA fue efectivo para la concentración y detección del material genético en los análisis moleculares, los reactivos que se utilizaron en esta técnica (isopropanol y etanol) provocaron una lisis casi completa de los virus. Esto se evidenció en la reducción parcial y total de la infectividad en los ensayos con HAV y MNV, respectivamente. En contraste, el método AP conservó la infectividad viral en ambos virus, sin reducciones significativas en los niveles de virus infecciosos detectados tras la concentración. Estos resultados subrayan la importancia de elegir el método en función del objetivo planteado. Por un lado, el método TNA es más adecuado para la detección molecular de SARS-CoV-2 y de determinados virus entéricos e indicadores, mostrando una mayor sensibilidad en los análisis mediante RT-qPCR, así como una mayor cobertura genómica y rendimiento en la secuenciación de SARS-CoV-2. Por otra parte, el método AP resulta más apropiado en estudios donde es importante conservar la infectividad viral, ya que preserva mejor la infectividad de los virus presentes en las muestras. En conjunto, estos hallazgos confirman que los métodos de concentración son un factor crítico en la vigilancia de virus humanos entéricos y SARS-CoV-2. En este sentido, los resultados del estudio *Evaluation of two different concentration methods for surveillance of human viruses in sewage and their effects on SARS-CoV-2 sequencing* (Girón-Guzmán et al., 2023a) proporcionan nueva evidencia sobre el impacto de los métodos de concentración en estudios de WBE, permitiendo mejorar esta herramienta para su uso en epidemiología.

2.4. Estudio longitudinal del proceso de aguas regeneradas como posible riesgo multifactorial para la salud pública

La presencia de patógenos en aguas residuales ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la creciente escasez hídrica, junto con la necesidad de reutilizar estas aguas para diferentes fines, principalmente el riego de cultivos agrícolas, así como el uso de los biosólidos generados en las EDARs como fertilizantes, hacen necesario evaluar su calidad microbiológica. Por ello, se realizó un estudio centrado en la evaluación del riesgo asociado a esta estrategia de reutilización de aguas regeneradas y biosólidos, mediante el análisis de diferentes patógenos, así como la capacidad de reducción de estos tras los tratamientos realizados en las EDARs.

Durante el año 2022 se muestrearon mensualmente influentes, efluentes y biosólidos de seis EDARs (n=216) de la Comunidad Valenciana (España) y se analizó la presencia de diferentes contaminantes: virus, *Escherichia coli* (totales y productoras de 'betalactamasas de espectro extendido' (BLEE)), genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) y

microplásticos (MPs). Los influentes (40 mL) se concentraron utilizando el método TNA, mientras que los efluentes (200 mL) se procesaron mediante el método AP. Para los biosólidos se realizó una dilución 1:10 en solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés Phosphate Buffered Saline). La extracción del material genético se realizó utilizando un sistema automatizado Maxwell® RSC Instrument (Promega, España) y la detección y cuantificación de virus entéricos (HuNoV GI, HuNoV GII, HEV, HAV, HAstV y RV), respiratorios (SARS-CoV-2, IAV y RSV) e indicadores (PMMoV y crAssphage) se realizó mediante RT-qPCR o qPCR. La determinación de colifagos somáticos se llevó a cabo mediante técnicas de recuento en placa basado en la ISO 10705-2 (UNE-EN ISO, 2002).

Las concentraciones promedio de virus entéricos en los influentes oscilaron entre 3,47 log cg/L de HAV hasta los 8,55 log cg/L en el caso de RV. En relación a los niveles de los indicadores, se detectaron unos valores de concentración medios de 5,95 log cg/L y 8,44 log cg/L para PMMoV y crAssphage, respectivamente, y de 6,54 log de unidades formadoras de calvas (ufc)/100 mL en el caso de los colifagos somáticos. Aunque las concentraciones de todos los virus se redujeron tras el tratamiento de las EDARs, en los efluentes analizados los niveles se redujeron en menos de 2 órdenes logarítmicos, lo que sugiere una persistencia elevada, incluso después de los tratamientos de UV o cloración aplicados en las diferentes EDARs analizadas. Únicamente se produjo una reducción significativa en el caso de HEV, el cual no se detectó en ninguna de las muestras de efluentes analizadas. En el caso de los biosólidos, HuNoV GI, HuNoV GII, HAstV y RV mostraron las concentraciones medias más altas, con valores de concentración entre 5,37 (HuNoV GI) y 7,27 (RV) log (gc)/L. Los niveles medios de las concentraciones de virus fueron muy similares a los observados en los influentes, resaltando el riesgo que supondría utilizarlos como fertilizantes en campos de cultivo agrícolas.

A pesar de que la detección de virus mediante RT-qPCR no informa sobre la infectividad de estos patógenos, varias publicaciones han señalado la presencia de virus entéricos infecciosos en aguas regeneradas mediante ensayos de integridad de la cápside o cultivo celular. Según el Reglamento (UE) 2020/741 sobre los requisitos mínimos para reutilización del agua, las reducciones logarítmicas para colifagos somáticos están establecidas en un mínimo de 6 órdenes logarítmicos. En este estudio, las reducciones medias para este indicador fueron de 1,83 órdenes logarítmicos, valor muy alejado del estipulado en el reglamento.

Respecto a los virus respiratorios, en los últimos años se ha discutido la posibilidad de su transmisión a través de agua y alimentos. En los influentes, RSV se detectó únicamente durante los meses de invierno, con la excepción de una muestra positiva en una de las EDARs en julio de 2022. Por su parte, IAV alcanzó las mayores concentraciones en invierno. Los valores promedio de las concentraciones de estos dos virus fueron 6,20 log cg/L y 4,57

log cg/L para IAV y RSV, respectivamente. Todos los efluentes analizados fueron negativos para ambos virus, mientras que en biosólidos se detectó IAV en un 4,1% de las muestras y RSV en un 2,8%, lo que sugiere que el riesgo de transmisión, teniendo en cuenta la baja prevalencia y el hecho de que sólo se detectan trazas de material genético, sería muy bajo.

Por el contrario, SARS-CoV-2 se detectó en el 99% de las muestras de influentes, con concentraciones medias de 5,27 log cg/L, y en el 32% de los efluentes, con concentraciones medias de 4,12 log cg/L. Estos resultados evidencian la necesidad de realizar estudios adicionales para profundizar en los riesgos que la presencia de virus respiratorios en aguas podría representar para la salud pública.

En conclusión, los procesos de tratamiento actualmente implementados en las EDARs analizadas presentan limitaciones para eliminar completamente el riesgo de transmisión de virus a través de aguas tratadas y biosólidos destinados a la agricultura. Para abordar integralmente los riesgos asociados con la reutilización de las aguas regeneradas, es esencial mejorar las tecnologías de tratamiento de aguas y biosólidos, además de adoptar políticas más estrictas para proteger la salud pública y promover prácticas sostenibles. Este trabajo, publicado en el artículo *Longitudinal study on the multifactorial public health risks associated with sewage reclamation* (Girón-Guzmán et al., 2024b), revela la importancia de seguir investigando y mejorando los sistemas de tratamiento y vigilancia de aguas residuales, con el fin de minimizar los riesgos asociados a su reutilización en agricultura y otros usos.

2.5. Estabilidad viral en ambientes acuáticos

La detección de virus en efluentes y biosólidos implica la potencial entrada de estos patógenos en la cadena alimentaria y la afección de la población y el medio ambiente. Por ello, es importante conocer la estabilidad de los virus en aguas. Aunque existe mucha información sobre la estabilidad de los virus entéricos en el agua, todavía son escasos los estudios con otros virus que potencialmente pueden encontrarse en el agua, y no se puede descartar el agua como vía secundaria de transmisión. Por ello, en el marco de esta tesis doctoral, se investigó la estabilidad de virus entéricos, respiratorios y emergentes en efluentes y agua potable.

Estos ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura y se utilizó un agua de referencia (RW), preparada con agua Milli-Q NaCl 7 nM, agua potable (DW), procedente de la red municipal, y efluente de planta depuradora (EW). Inicialmente se caracterizaron los parámetros físico-químicos de estas muestras y se inocularon artificialmente con suspensiones de MNV, HAV, IAV (H3N2), coronavirus humano 229E (HCoV-229E) y virus vaccinia (VACV), siendo estos dos últimos virus modelos de SARS-CoV-2 y MPXV,

respectivamente. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C) y de refrigeración (4 °C) y se recogieron alícuotas por triplicado en diferentes intervalos de tiempo (0h, 24h, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 semanas). El estudio de la infectividad se llevó a cabo inicialmente mediante cultivos celulares, utilizando las líneas celulares específicas para cada virus incluidos en el estudio. La reducción de los niveles de los virus se calculó como $\log_{10} (N_x/N_0)$, donde N_0 representa la concentración de virus infecciosos a tiempo 0 y N_x la concentración de virus infecciosos en cada tiempo de muestreo. Los resultados se modelizaron mediante regresión lineal en función del tiempo, considerando cada condición de temperatura y tipo de agua. Posteriormente, las constantes de decaimiento, k , se compararon junto con sus intervalos de confianza del 95% para determinar si había diferencias significativas en la velocidad de inactivación de cada uno de los virus bajo las condiciones experimentales ensayadas. Finalmente, aunque el cultivo celular es una de las técnicas más extendidas para evaluar la infectividad de los virus, en este estudio también se realizaron ensayos mediante PCR de viabilidad, utilizando los compuestos intercalantes propidio de monoazida (PMAxx™) y cloruro de platino (IV) ($PtCl_4$). Los resultados se compararon con los obtenidos mediante cultivo celular. Para estos ensayos, se seleccionaron las muestras DW y EW a tiempo 0h, 1, 4, 8, 12 y 14 semanas a 25 °C.

Tras los análisis mediante cultivo celular, se observó que los virus entéricos sobrevivieron durante más tiempo que los no entéricos, en línea con los resultados obtenidos en trabajos previos (La Rosa *et al.*, 2020; Sánchez and Bosch, 2016; Vasickova *et al.*, 2010). La infectividad del MNV disminuyó significativamente después de 3 semanas a 25 °C, mientras que a 4 °C solamente presentó reducción tras 12 semanas. A 25 °C, la infectividad del HAV disminuyó gradualmente, por el contrario, a 4 °C aún se seguían detectando virus infecciosos después de 14 semanas. Con estos datos se calcularon las constantes de decaimiento, obteniéndose valores de 0,056, 0,228 y 0,155 log/día para el HAV en agua de referencia, agua potable y efluente a 25 °C, respectivamente. En las mismas matrices a 4 °C, las tasas fueron 0,057, 0,155 y 0,083 log/día. En el caso del MNV, las tasas de decaimiento se establecieron en 0,029, 0,039 y 0,040 log/día para agua de referencia, agua potable y agua efluente a 4 °C, respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre los valores k para diferentes tipos de agua. Estas tasas fueron de 0,187, 0,168 y 0,230 en las mismas matrices de agua, pero almacenadas a 25 °C.

En los experimentos con virus no entéricos, HCoV-229E, IAV y VACV, los resultados mostraron la completa inactivación de los mismos entre 1 y 2 semanas en DW y EW a 25 °C, mientras que su estabilidad fue mayor a 4 °C y en agua de referencia. En el caso de IAV, se detectó hasta los 84 días (12 semanas) en efluentes y hasta los 98 días (14 semanas) en agua de referencia a 4 °C. En general, comparando los tres virus, los valores de k , indicaron que IAV era el más estable, seguido por HCoV-229E y, finalmente, VACV. Además, los tres virus

mostraron mayor estabilidad en agua de referencia que en agua potable o en efluentes, probablemente debido a la presencia de microbiota en estas últimas.

Los ensayos basados en técnicas moleculares se realizaron mediante (RT)-qPCR para determinar la persistencia del material genético del virus, y mediante PCR de viabilidad para estimar la estabilidad de virus infecciosos mediante la integridad de sus cápsides. Estas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se basan en la integridad de las cápsides virales para realizar una aproximación sobre la infectividad de los virus. Este enfoque utiliza principalmente reactivos que se intercalan en el ADN o el ARN y que sólo penetran en los viriones con cápsides comprometidas. Aunque estas metodologías han demostrado su efectividad frente a tratamientos extremos de presión y temperatura (Randazzo *et al.*, 2018), diferentes estudios indican que no son lo suficientemente confiables como para asociar directamente la detección molecular con la infectividad real. Por ello, en el marco de esta tesis doctoral, se evaluó esta aproximación para los virus no entéricos en estudio, comprobando su eficacia mediante la comparación con la infectividad medida por cultivo celular.

En general, los resultados mostraron que ni el PMAxx ni el PtCl₄ lograron disminuir la señal del material genético de virus no infecciosos. Las reducciones observadas en las concentraciones de IAV, HCoV-229E y VACV, medidas mediante técnicas moleculares en ambos tipos de agua, no reflejaron la inactivación observada por cultivo celular. Mientras que estos virus se inactivaron por completo tras 1-2 semanas de almacenamiento a 25 °C, las técnicas moleculares ensayadas continuaron detectando concentraciones elevadas de material genético. A modo de ejemplo, el VACV en agua potable se mantuvo infeccioso sólo durante 1 semana, sin embargo, su material genético se detectó incluso después de 14 semanas, independientemente del uso de reactivos de viabilidad. En el caso de IAV, HCoV-229E y VACV en efluentes, la señal del material genético solo se redujo completamente tras 14 semanas de almacenamiento, mientras que la infectividad se eliminó tras 1 (HCoV-229E y VACV) y 2 semanas de almacenamiento (IAV).

Este trabajo ha permitido explorar los factores que influyen en la estabilidad de virus entéricos y respiratorios en ambientes acuáticos. De este modo, se pudo demostrar que la naturaleza de los virus, la matriz y las condiciones ambientales (tipo de agua y temperatura) afectan significativamente su estabilidad. La continuación de estos estudios es esencial para determinar si los virus presentes en el agua pueden impactar en la salud de la población y para asesorar de forma precisa sobre la calidad y seguridad de las aguas y los alimentos que consumimos. Además, dada la baja eficiencia de los reactivos ensayados, se requiere una investigación más profunda sobre el uso de estas técnicas de evaluación de la integridad de la cápside que permitan inferir la infectividad de los virus en este tipo de muestras. Este estudio se encuentra descrito en el artículo *Survival of viruses in water microcosms* (Girón-Guzmán *et al.*, 2025)

3. CONCLUSIONES

Esta tesis doctoral refuerza el potencial de la epidemiología basada en aguas residuales como herramienta de vigilancia para múltiples patógenos, demostrando su capacidad para monitorizar eficazmente diversos virus respiratorios que circulan en la población, como SARS-CoV-2, RSV e influenza A. Los resultados obtenidos muestran que los modelos predictivos permiten correlacionar las concentraciones virales detectadas en aguas residuales con el número de casos clínicos reportados. En la EDAR analizada, los virus podían detectarse en muestras de aguas residuales cuando se reportaban al menos 40 y 110 casos clínicos para RSV e influenza A, respectivamente. Asimismo, la normalización de las concentraciones virales mediante el caudal de entrada de aguas residuales ($\text{m}^3/\text{día}$) proporcionó resultados más robustos que la normalización basada en indicadores virales.

Las metodologías desarrolladas durante la pandemia de SARS-CoV-2, junto con la red de vigilancia epidemiológica establecida, permiten además una rápida adaptación de los procedimientos y una respuesta ágil ante la aparición de nuevos patógenos, como se evidenció durante el brote de MPXV en 2022. No obstante, el uso de la epidemiología basada en aguas residuales para la vigilancia epidemiológica de MPXV no resultó eficaz como herramienta de alerta temprana, ya que no permitió predecir la aparición de casos clínicos. Aun así, el seguimiento de la enfermedad en la población de manera objetiva y no invasiva si pudo llevarse a cabo, complementando la epidemiología tradicional.

Por otra parte, los métodos de concentración y detección de virus en aguas residuales desempeñan un papel crítico en el desarrollo de estrategias de vigilancia epidemiológica, ya que influyen significativamente en los resultados obtenidos. Las diferencias en estos métodos pueden conducir a una subestimación de muestras positivas para determinados patógenos, lo que podría sesgar los resultados de los modelos predictivos. En este contexto, el método de captura directa evaluado mostró una mayor sensibilidad en la detección de SARS-CoV-2, HuNoV y HEV mediante RT-qPCR, así como un mejor rendimiento en la secuenciación genómica de SARS-CoV-2.

En relación con el ciclo urbano del agua, los sistemas de regeneración empleados en las estaciones depuradoras estudiadas no alcanzaron las reducciones logarítmicas establecidas por la normativa europea EU 2020/741, por lo que el agua regenerada no cumplía con los estándares requeridos para su uso agrícola. Asimismo, la elevada presencia de virus entéricos en los biosólidos generados por las EDAR pone de manifiesto los posibles riesgos para la salud asociados a su utilización como fertilizante.

Finalmente, los estudios de estabilidad viral mostraron que los virus entéricos presentan una mayor estabilidad que IAV, HCoV-229E y VACV, siendo HAV el virus más estable, manteniendo

su capacidad infecciosa durante un periodo de hasta 98 días. Además, las tasas de inactivación de los virus analizados fueron más rápidas en agua regenerada y agua potable frente al agua de referencia. Por último, los resultados obtenidos indican que la detección basada únicamente en RT-qPCR, incluso tras la aplicación de pretratamientos de viabilidad con agentes intercalantes, no es suficiente para evaluar la infectividad de virus como IAV, HCoV-229E y VACV en aguas.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, F.X., Pintó, R.M., Villena, C., Gajardo, R., Bosch, A., 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3119. doi.org/10.1128/AEM.63.8.3119-3122.1997
- Acosta, N., Bautista, M.A., Hollman, J., McCaig, J., Beaudet, A.B., Man, L., Waddell, B.J., Chen, J., Li, C., Kuzma, D., Bhatnagar, S., Leal, J., Meddings, J., Hu, J., Cabaj, J.L., Ruecker, N.J., Naugler, C., Pillai, D.R., Achari, G., Ryan, M.C., Conly, J.M., Frankowski, K., Hubert, C.R., Parkins, M.D., 2021. A multicenter study investigating SARS-CoV-2 in tertiary-care hospital wastewater: viral burden correlates with increasing hospitalized cases as well as hospital-associated transmissions and outbreaks. *Water Res.* 201, 117369. doi.org/10.1016/j.watres.2021.117369
- Amores, M.J., Meneses, M., Pasqualino, J., Antón, A., Castells, F., 2013. Environmental assessment of urban water cycle on Mediterranean conditions by LCA approach. *J. Clean. Prod.* 43, 84–92. doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.12.033
- Awad, D.A., Masoud, H.A., Hamad, A., 2024. Climate changes and food-borne pathogens: the impact on human health and mitigation strategy. *Clim. Change* 177, 1–25. doi.org/10.1007/S10584-024-03748-9
- Barril, P.A., Pianciola, L.A., Mazzeo, M., Ousset, M.J., Jaureguiberry, M.V., Alessandrello, M., Sánchez, G., Oteiza, J.M., 2021. Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters. *Science of the Total Environment* 756, 144105. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144105
- Benschop, K.S.M., van der Avoort, H.G., Jusic, E., Vennema, H., van Binnendijk, R., Duizer, E., 2017. Polio and measles down the drain: Environmental enterovirus surveillance in the Netherlands, 2005 to 2015. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–12. doi.org/10.1128/AEM.00558-17
- Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S.J., Park, H., Volchkov, P., 2021. Avian influenza in wild birds and poultry: Dissemination pathways, monitoring methods, and virus ecology. *Pathogens* 10, 1–23. doi.org/10.3390/pathogens10050630
- Boehm, A.B., Hughes, B., Duong, D., Chan-Herur, V., Buchman, A., Wolfe, M.K., White, B.J., 2023. Wastewater concentrations of human influenza, metapneumovirus, parainfluenza, respiratory syncytial virus, rhinovirus, and seasonal coronavirus nucleic-acids during the COVID-19 pandemic: a surveillance study. *Lancet Microbe* 4, e340–e348. doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00386-X
- Bosch, A., Guix, S., Sano, D., Pintó, R.M., 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 295–301. doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.006
- Canh, V.D., Kasuga, I., Furumai, H., Katayama, H., 2019. Viability RT-qPCR Combined with Sodium Deoxycholate Pre-treatment for Selective Quantification of Infectious Viruses in Drinking Water Samples. *Food Environ. Virol.* 11, 40–51. <https://doi.org/10.1007/S12560-019-09368-2>

- Carmona-Vicente, N., Pandiscia, A., Santiso-Bellón, C., Perez-Cataluña, A., Rodríguez-Díaz, J., Costantini, V.P., Buesa, J., Vinjé, J., Sánchez, G., Randazzo, W., 2024. Human intestinal enteroids platform to assess the infectivity of gastroenteritis viruses in wastewater. *Water Res.* 255. doi.org/10.1016/J.WATRES.2024.121481
- CDC, 2023. Wastewater surveillance data reporting and analytics | National Wastewater Surveillance System | CDC.
- Cerda, J., Valdivia, G., 2007. John Snow, la epidemia de cólera y el nacimiento de la epidemiología moderna. *Revista Chilena de Infectología* 24, 331–334. doi.org/10.4067/s0716-10182007000400014
- Chacón, L., Morales, E., Valiente, C., Reyes, L., Barrantes, K., 2021. Wastewater-based epidemiology of enteric viruses and surveillance of acute gastrointestinal illness outbreaks in a resource-limited region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 105, 1004–1012. doi.org/10.4269/ajtmh.21-0050
- Christou, L., Kosmidou, M., 2013. Hepatitis e virus in the western world-a pork-related zoonosis. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 600–604. doi.org/10.1111/1469-0691.12214
- Corpuz, M.V.A., Buonerba, A., Vigliotta, G., Zarra, T., Ballesteros, F., Campiglia, P., Belgiorio, V., Korshin, G., Naddeo, V., 2020. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Science of the Total Environment* 745, 140910. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910
- Crits-Christoph, A., Kantor, R.S., Olm, M.R., Whitney, O.N., Al-Shayeb, B., Lou, Y.C., Flamholz, A., Kennedy, L.C., Greenwald, H., Hinkle, A., Hetzel, J., Spitzer, S., Koble, J., Tan, A., Hyde, F., Schroth, G., Kuersten, S., Banfield, J.F., Nelson, K.L., 2021. Genome Sequencing of Sewage Detects Regionally Prevalent SARS-CoV-2 Variants. *mBio* 12. doi.org/10.1128/mbio.02703-20
- Cuevas-Ferrando, E., Randazzo, W., Pérez-Cataluña, A., Sánchez, G., 2020. HEV Occurrence in Waste and Drinking Water Treatment Plants. *Front. Microbiol.* 10. doi.org/10.3389/fmicb.2019.02937
- Desdouits, M., Polo, D., Le Mennec, C., Strubbia, S., Zeng, X.L., Ettayebi, K., Atmar, R.L., Estes, M.K., Le Guyader, F.S., 2022. Use of Human Intestinal Enteroids to Evaluate Persistence of Infectious Human Norovirus in Seawater. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 1475. doi.org/10.3201/EID2807.220219
- EC, 2020. Regulation (EU) 2020/741 of the European Parliament and of the Council of 25 May 2020 on minimum requirements for water reuse.
- EC, 2021. Commission Recommendation (EU) 2021/472 of 17 March 2021 on a common approach to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewaters in the EU - Publications Office of the EU.
- Falcó, I., Randazzo, W., Gómez-Mascaraque, L.G., Aznar, R., López-Rubio, A., Sánchez, G., 2018. Fostering the antiviral activity of green tea extract for sanitizing purposes through controlled storage conditions. *Food Control* 84, 485–492. doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.037
- Farkas, K., Mannion, F., Hillary, L.S., Malham, S.K., Walker, D.I., 2020. Emerging technologies for the rapid detection of enteric viruses in the aquatic environment. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 16, 1–6. doi.org/10.1016/J.COESH.2020.01.007
- Farkas, K., Pellett, C., Alex-Sanders, N., Bridgman, M.T.P., Corbishley, A., Grimsley, J.M.S., Kasprzyk-Hordern, B., Kevill, J.L., Pântea, I., Richardson-O'Neill, I.S., Lambert-Slosarska, K., Woodhall, N., Jones, D.L., 2022. Comparative Assessment of Filtration- and Precipitation-Based Methods for the Concentration of SARS-CoV-2 and Other Viruses from Wastewater. *Microbiol. Spectr.* 10. doi.org/10.1128/spectrum.01102-22
- Frérot, M., Lefebvre, A., Aho, S., Callier, P., Astruc, K., Glélé, S.A., 2018. What is epidemiology? Changing definitions of epidemiology 1978-2017. *PLoS One* 13. doi.org/10.1371/journal.pone.0208442

- Galani, A., Aalizadeh, R., Kostakis, M., Markou, A., Alygizakis, N., Lytras, T., Adamopoulos, P.G., Peccia, J., Thompson, D.C., Kontou, A., Karagiannidis, A., Lianidou, E.S., Avgeris, M., Paraskevis, D., Tsiodras, S., Scorilas, A., Vasiliou, V., Dimopoulos, M.A., Thomaidis, N.S., 2022. SARS-CoV-2 wastewater surveillance data can predict hospitalizations and ICU admissions. *Science of the Total Environment* 804, 150151. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150151
- Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Rock, C.M., 2018. Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. *Water Res.* doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.044
- Girón-Guzmán, I., Díaz-Reolid, A., Cuevas-Ferrando, E., Falcó, I., Cano-Jiménez, P., Comas, I., Pérez-Cataluña, A., Sánchez, G., 2023a. Evaluation of two different concentration methods for surveillance of human viruses in sewage and their effects on SARS-CoV-2 sequencing. *Science of the Total Environment* 862. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160914
- Girón-Guzmán, I., Díaz-Reolid, A., Truchado, P., Carcereny, A., García-Pedemonte, D., Hernáez, B., Bosch, A., Pintó, R.M., Guix, S., Allende, A., Alcamí, A., Pérez-Cataluña, A., Sánchez, G., 2023b. Spanish wastewater reveals the current spread of Monkeypox virus. *Water Res.* 231, 119621. doi.org/10.1016/j.watres.2023.119621
- Girón-Guzmán, I., Cuevas-Ferrando, E., Barranquero, R., Díaz-Reolid, A., Puchades-Colera, P., Falcó, I., Pérez-Cataluña, A., Sánchez, G., 2024a. Urban wastewater-based epidemiology for multi-viral pathogen surveillance in the Valencian region, Spain. *Water Res.* 255, 121463. doi.org/10.1016/j.watres.2024.121463
- Girón-Guzmán, I., Sánchez-Alberola, S., Cuevas-Ferrando, E., Falcó, I., Díaz-Reolid, A., Puchades-Colera, P., Ballesteros, S., Pérez-Cataluña, A., Coll, J.M., Núñez, E., Fabra, M.J., López-Rubio, A., Sánchez, G., 2024b. Longitudinal study on the multifactorial public health risks associated with sewage reclamation. *NPJ Clean Water* 7. doi.org/10.1038/s41545-024-00365-y
- Girón-Guzmán, I., Falcó, I., Cuevas-Ferrando, E., Ballesteros, S., Barranquero, R., Sánchez, G., 2025. Survival of viruses in water microcosms. *Science of The Total Environment* 963, 178416. doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2025.178416
- Guo, Y., Li, J., O'Brien, J., Sivakumar, M., Jiang, G., 2022. Back-estimation of norovirus infections through wastewater-based epidemiology: A systematic review and parameter sensitivity. *Water Res.* 219, 118610. doi.org/10.1016/j.watres.2022.118610
- Hernaez, B., Muñoz-Gómez, A., Sanchiz, A., Orviz, E., Valls-Carbo, A., Sagastagoitia, I., Ayerdi, O., Martín, R., Puerta, T., Vera, M., Cabello, N., Vergas, J., Prieto, C., Pardo-Figueroa, M., Negro, A., Lagarón, J.M., del Romero, J., Estrada, V., Alcamí, A., 2023. Monitoring monkeypox virus in saliva and air samples in Spain: a cross-sectional study. *Lancet Microbe* 4, e21–e28. doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00291-9
- Hsu, S.Y., Bayati, M., Li, C., Hsieh, H.Y., Belenchia, A., Klutts, J., Zemmer, S.A., Reynolds, M., Semkiw, E., Johnson, H.Y., Foley, T., Wieberg, C.G., Wenzel, J., Johnson, M.C., Lin, C.H., 2022. Biomarkers selection for population normalization in SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology. *Water Res.* 223, 118985. doi.org/10.1016/j.watres.2022.118985
- ISO, 2002. UNE-EN ISO 10705-2:2002 Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos.
- Kennedy, L.C., Costantini, V.P., Huynh, K.A., Loeb, S.K., Jennings, W.C., Lowry, S., Mattioli, M.C., Vinjé, J., Boehm, A.B., 2023. Persistence of Human Norovirus (GI) in Surface Water: Decay Rate Constants and Inactivation Mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 57, 3671–3679. doi.org/10.1021/ACS.EST.2C09637
- Kirby, R.M., Bartram, J., Carr, R., 2003. Water in food production and processing: Quantity and quality concerns. *Food Control* 14, 283–299. doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00090-7
- La Rosa, G., Bonadonna, L., Lucentini, L., Kenmoe, S., Suffredini, E., 2020. Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods – A scoping review. *Water Res.* 179, 115899. doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899

- Lefrançois, T., Malvy, D., Atlani-Duault, L., Benamouzig, D., Druais, P.L., Yazdanpanah, Y., Delfraissy, J.F., Lina, B., 2023. After 2 years of the COVID-19 pandemic, translating One Health into action is urgent. *The Lancet* 401, 789–794. doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01840-2
- Li, D., Gu, A.Z., He, M., Shi, H.C., Yang, W., 2009. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. *Water Res.* 43, 3261–3269. doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.03.044
- Linderhof, V., de Lange, T., Reinhard, S., 2021. The Dilemmas of Water Quality and Food Security Interactions in Low- and Middle-Income Countries. *Frontiers in Water* 3, 1–17. doi.org/10.3389/frwa.2021.736760
- Lodder, W.J., Van Den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A., De Roda Husman, A.M., 2010. Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5965. doi.org/10.1128/AEM.00245-10
- Mantovi, P., Baldoni, G., Toderi, G., 2005. Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: Effects of long-term application on soil and crop. *Water Res.* 39, 289–296. doi.org/10.1016/j.watres.2004.10.003
- Mao, K., Zhang, K., Du, W., Ali, W., Feng, X., Zhang, H., 2020. The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 17, 1–7. doi.org/10.1016/j.coesh.2020.04.006
- Markt, R., Stillebacher, F., Nägele, F., Kammerer, A., Peer, N., Payr, M., Scheffknecht, C., Dria, S., Draxl-Weiskopf, S., Mayr, M., Rauch, W., Kreuzinger, N., Rainer, L., Bachner, F., Zuba, M., Ostermann, H., Lackner, N., Insam, H., Wagner, A.O., 2023. Expanding the Pathogen Panel in Wastewater Epidemiology to Influenza and Norovirus. *Viruses* 15. doi.org/10.3390/v15020263
- Mateo-Sagasta, J., Raschid-Sally, L., Thebo, A., 2015. Global Wastewater and Sludge Production, Treatment and Use, in: *Wastewater: Economic Asset in an Urbanizing World*. Springer Netherlands, pp. 15–38. doi.org/10.1007/978-94-017-9545-6
- McCall, C., Wu, H., O'Brien, E., Xagorarakis, I., 2021. Assessment of enteric viruses during a hepatitis outbreak in Detroit MI using wastewater surveillance and metagenomic analysis. *J. Appl. Microbiol.* 131, 1539–1554. doi.org/10.1111/jam.15027
- Mehle, N., Gutiérrez-Aguirre, I., Kutnjak, D., Ravnikar, M., 2018. Water-Mediated Transmission of Plant, Animal, and Human Viruses. *Adv. Virus Res.* 101, 85–128. doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.004
- Nemudryi, A., Nemudraia, A., Wiegand, T., Surya, K., Buyukyoruk, M., Cicha, C., Vanderwood, K.K., Wilkinson, R., Wiedenheft, B., 2020. Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Rep. Med.* 1, 100098. doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100098
- Olesen, S.W., Imakaev, M., Duvallet, C., 2021. Making waves: Defining the lead time of wastewater-based epidemiology for COVID-19. *Water Res.* 202, 117433. doi.org/10.1016/j.watres.2021.117433
- Orviz, E., Negredo, A., Ayerdi, O., Vázquez, A., Muñoz-Gomez, A., Monzón, S., Clavo, P., Zaballos, A., Vera, M., Sánchez, P., Cabello, N., Jiménez, P., Pérez-García, J.A., Varona, S., del Romero, J., Cuesta, I., Delgado-Iribarren, A., Torres, M., Sagastagoitia, I., Palacios, G., Estrada, V., Sánchez-Seco, M.P., Ballesteros, J., Baza, B., Carrió, J.C., Chocron, C., Fedele, G., García-Amil, C., Herrero, L., Homen, R., Mariano, A., Martínez-Burgoa, T., Molero, F., Navarro, M.L., Núñez, M.J., Perez-Somarriba, J., Puerta, T., Rodríguez-Añover, J., Pastrana, E.P., Jiménez, M., de la Vega, L., Vergas, J., Zarza, I., 2022. Monkeypox outbreak in Madrid (Spain): Clinical and virological aspects. *Journal of Infection* 85, 412–417. doi.org/10.1016/j.jinf.2022.07.005
- Oude Munnink, B.B., van der Hoek, L., 2016. Viruses causing gastroenteritis: The known, the new and those beyond. *Viruses* 8. doi.org/10.3390/v8020042
- Peiro-Mestres, A., Fuertes, I., Camprubi-Ferrer, D., Marcos, M.A., Vilella, A., Navarro, M., Rodriguez-Elena, L., Riera, J., Catala, A., Martinez, M.J., Blanco, J.L., 2022. Frequent detection of monkeypox

- virus DNA in saliva, semen, and other clinical samples from 12 patients, Barcelona, Spain, May to June 2022. *Eurosurveillance* 27, 2200503. doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.28.2200503
- Pérez-Cataluña, A., Chiner-Oms, Á., Cuevas-Ferrando, E., Díaz-Reolid, A., Falcó, I., Randazzo, W., Girón-Guzmán, I., Allende, A., Bracho, M.A., Comas, I., Sánchez, G., 2022. Spatial and temporal distribution of SARS-CoV-2 diversity circulating in wastewater. *Water Res.* 211. doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.118007
 - Pérez-Cataluña, A., Cuevas-Ferrando, E., Randazzo, W., Falcó, I., Allende, A., Sánchez, G., 2021. Comparing analytical methods to detect SARS-CoV-2 in wastewater. *Sci. Total Environ.* 758. doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143870
 - Pinon, A., Vialette, M., 2019. Survival of viruses in water. *Intervirology* 61, 214–222. doi.org/10.1159/000484899
 - Polo, D., Quintela-Baluja, M., Corbishley, A., Jones, D.L., Singer, A.C., Graham, D.W., Romalde, J.L., 2020. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Res.* 186, 116404. doi.org/10.1016/j.watres.2020.116404
 - Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G., 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 181, 115942. doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942
 - Randazzo, W., Vasquez-García, A., Aznar, R., Sánchez, G., 2018. Viability RT-qPCR to distinguish between HEV and HAV with intact and altered capsids. *Front. Microbiol.* 9, 409440. doi.org/10.3389/FMICB.2018.01973/BIBTEX
 - Regitano, J.B., Rodrigues, M.M., Martins, G.L., Osti, J.F., Viana, D.G., de Souza, A.J., 2022. Sewage Sludge Management for Environmental Sustainability: An Introduction, in: *Sustainable Management and Utilization of Sewage Sludge*. pp. 1–28. doi.org/10.1007/978-3-030-85226-9
 - Sánchez, G., Bosch, A., 2016. Survival of enteric viruses in the environment and food. In: *Viruses in Foods*. Springer, Cham, pp. 367–392. doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7_13
 - Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R., 2012. Discrimination of Infectious Hepatitis A Viruses by Propidium Monoazide Real-Time RT-PCR. *Food Environ. Virol.* 4, 21–25. doi.org/10.1007/S12560-011-9074-5/TABLES/3
 - Schenk, H., Heidinger, P., Insam, H., Kreuzinger, N., Markt, R., Nägele, F., Oberacher, H., Scheffknecht, C., Steinlechner, M., Vogl, G., Wagner, A.O., Rauch, W., 2023. Prediction of hospitalisations based on wastewater-based SARS-CoV-2 epidemiology. *Science of the Total Environment* 873. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162149
 - Shaffer, M., Huynh, K., Costantini, V., Bibby, K., Vinjé, J., 2022. Viable Norovirus Persistence in Water Microcosms. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 9, 851–855. doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.2C00553
 - Shevah, Y., 2015. Water Resources, Water Scarcity Challenges, and Perspectives. *ACS Symposium Series* 1206, 185–219. doi.org/10.1021/BK-2015-1206.CH010
 - Sims, N., Kasprzyk-Hordern, B., 2020. Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environ. Int.* 139, 105689. doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689
 - Tian, P., Brandi, M., Mandrell, R., 2005. Porcine gastric mucin binds to recombinant norovirus particles and competitively inhibits their binding to histo-blood group antigens and Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 315–320. doi.org/10.1111/J.1472-765X.2005.01775.X
 - UN-Water, 2021. Summary Progress Update 2021: SDG 6-water and sanitation for all.
 - Vasickova, P., Pavlik, I., Verani, M., Carducci, A., 2010. Issues concerning survival of viruses on surfaces. *Food Environ. Virol.* 2, 24–34. doi.org/10.1007/s12560-010-9025-6

- Velkers, F.C., Blokhuis, S.J., Veldhuis Kroeze, E.J.B., Burt, S.A., 2017. The role of rodents in avian influenza outbreaks in poultry farms: A review. *Veterinary Quarterly* 37, 182–194. doi.org/10.1080/01652176.2017.1325537
- Voulvoulis, N., 2018. Water reuse from a circular economy perspective and potential risks from an unregulated approach. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 2, 32–45. doi.org/10.1016/J.COESH.2018.01.005
- WHO, 2023. The One Health Definition and Principles Developed by OHHLEP Translations.
- WHO, 2020. Status of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus: Scientific brief. doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357
- WHO, FAO, 2008. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting report. 58.