



MONITOREO DE
SARS-CoV-2
EN AGUAS RESIDUALES

GUIA INSTRUCTIVA

Monitoreo de SARS-COV-2 en Aguas Residuales: Guía Instructiva

Publicación desarrollada en el marco del Programa SECOSAN de la Cooperación Suiza - SECO, implementado por Helvetas Perú, a solicitud de la Dirección de Saneamiento del Ministerio de Vivienda Construcción y Saneamiento.

Autores

El estudio fue encargado a el Centro de Investigación y Tecnología del Agua (CITA) de la Universidad de Ingeniería y Tecnología – UTEC, en conjunto con el Centro de investigación en Bioingeniería (BIO) de la UTEC y el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología en Plantas Sostenibles de Tratamiento de Aguas Residuales (INCT PTARs Sostenibles) de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) de Brasil. Con el apoyo de SEDAPAL, SEDAPAL y la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa.

Jefe del equipo de investigación: Mónica Santa María Fuster

Equipo Técnico

Isabel Solórzano Ortiz
Antonio Quispe Gutiérrez
Alberto Donayre Torres
Julio Valdivia Silva
Patrick Venail Zorro

Equipo de Campo y Laboratorio

Braulio Pardo Figueroa Dianderas
Fabrizzio Villar Acevedo
Elías Mindreau Ganoza
Alonso Reyes Calderón
Katherine García Luquillas
Makgyori Espinoza Huamán

SEDAPAL

Apoyo Técnico

Yuri Sánchez Merlo
Cesar Rashta Maguiña

UNSA

Responsable Técnico

Sonia Yufra Cruz

SEDAPAR

Apoyo Técnico

Giovanni Chávez Velando

Revisión y supervisión: **Max Carbajal N.** Director Nacional de Saneamiento del MVCS; **Jessica Cortez Flores.** Coordinadora en Fortalecimiento Sectorial; **Enma Salazar Agüero,** Especialista en Fortalecimiento Sectorial.

Editado por:

Programa SECOSAN de la Cooperación Suiza SECO, implementado por Helvetas Perú.
1era edición – febrero 2022

Diseño y diagramación

Franco Laynes

Se autoriza la reproducción total o parcial de esta publicación, bajo la condición de que se cite la fuente.

Este documento ha sido realizado por el equipo de investigación de la Universidad de Ingeniería y Tecnología-UTEC. Su contenido no necesariamente refleja la opinión del Gobierno Peruano, de sus instituciones o de sus funcionarios, así como de la Secretaría de Estado para Asuntos Económicos de la Confederación Suiza (SECO).

Se agradece las revisiones y los valiosos comentarios de Fernando Laca B. (Helvetas), Maritza Paliza F. (Helvetas), Bárbara Gonzales-Otoya (SECO Lima).

MONITOREO DEL SARS-COV-2 EN AGUAS RESIDUALES: GUIA INSTRUCTIVA

CONTENIDO

Definiciones y abreviaturas	3
Prólogo	4
1. Introducción	5
2. Objetivos del estudio	7
2.1. Objetivo General (OG)	7
2.2. Objetivos Específicos (OE)	7
3. Finalidad	7
4. Alcance	8
5. Marco conceptual	8
5.1. Prevalencia del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales	8
5.2. Detección del virus SARS-CoV-2 por PCR y RT-PCR	10
5.3. Epidemiología basada en aguas residuales aplicada a la detección de SARS-CoV-2	13
6. Aspectos y requisitos del laboratorio	16
6.1. Requisitos mínimos generales	16
a. Requisitos mínimos para el trabajo de campo	16
b. Requisitos mínimos para el trabajo de laboratorio	16
c. Requisitos mínimos para el trabajo de gabinete	18
6.2. Consideraciones del equipamiento del laboratorio especializado	18
a. Equipamiento requerido para la preparación de materiales para los ensayos (PL8)	18
b. Equipamiento requerido para la concentración de partículas virales en muestra de agua residual (PL3)	18
c. Equipamiento requerido para la purificación del material genético viral (ARN) (PL5)	19
d. Equipamiento requerido para las reacciones de RT-qPCR (PL6)	19
6.3. Consideraciones del personal requerido.	20
a. Personal requerido para el trabajo de campo.	20
b. Personal requerido para el trabajo de laboratorio	20
c. Personal requerido para el trabajo en gabinete	21
6.4. Otros insumos y materiales necesarios.	21
a. Materiales requeridos para el trabajo de campo (Tabla 2).	21
b. Materiales requeridos para el trabajo de laboratorio (Tabla 3 y Tabla 4).	22

7. Aspectos del protocolo para la toma, preservación, transporte, recepción y métodos de análisis de las muestras en el laboratorio	25
7.1. Protocolo para la toma de muestras en campo	25
a. Consideraciones previas a la colecta	25
b. Colecta de muestras en campo	26
7.2. Cadena de Custodia	29
7.3. Controles de calidad del muestreo	30
7.4. Protocolo para el análisis de las muestras en el laboratorio	31
a. Disposiciones generales	31
b. Concentración de partículas virales	31
c. Purificación de ácidos nucleicos (ARN)	34
d. Amplificación por RT-qPCR	38
8. Aspectos del plan de monitoreo	51
8.1. Recursos necesarios	51
a. Data de la red de alcantarillado	51
b. Data de la población	51
c. Data del sector Salud	51
8.2. Diseño del plan de monitoreo	52
8.3. Tipo de muestra y frecuencia	53
9. Aspectos del registro, procesamiento e interpretación de resultados para divulgación	54
a. Sobre la colecta de la muestra	55
b. Sobre el proceso de filtración	55
c. Sobre el proceso de purificación de ARN	55
d. Sobre el proceso de amplificación por RT-qPCR	55
e. Sobre los cálculos	55
f. Sobre el reporte	58
10. Consideraciones finales	59
11. Recomendaciones	60
12. Anexos	61
ANEXO 1	61
ANEXO 2	63
ANEXO 3	64
ANEXO 4	67
13. Referencias	68

Definiciones y abreviaturas

COVID-19, Corona Virus Disease 2019 (enfermedad del coronavirus del 2019).

DQO, Demanda Química de Oxígeno.

EPP, Equipo de Protección Personal.

EPS, Empresa Prestadora de servicios de Saneamiento.

GIS, Sistema de información geográfica (en inglés, *Geographic Information System*).

GPS, Sistema de posicionamiento global (en inglés, *Global Positioning System*).

INEI, Instituto Nacional de Estadística e Informática de Perú.

MINSA, Ministerio de Salud.

MVCS, Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento.

NSE, Nivel socioeconómico.

OMS, Organización Mundial de la Salud.

PTAR, Planta de Tratamiento de Agua Residual.

PCR, Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

RT-qPCR, PCR cuantitativo con transcripción reversa (en inglés, *Quantitative Reverse Transcription PCR*).

SARS-CoV-2, Síndrome respiratorio agudo severo CoronaVirus 2 (en inglés, *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*).

SEDAPAL, Empresa prestadora de Servicios de Agua Potable y Alcantarillado de Lima.

SEDAPAR, Empresa prestadora de Servicios de Agua Potable y Alcantarillado de Arequipa.

SINADEF, Sistema Informático Nacional de Defunciones.

UTM, Sistema de coordenadas universal transversal de Mercator (en inglés, *Universal Transverse Mercator*).

WBE, Epidemiología basada en aguas residuales (en inglés, *Wastewater-Based Epidemiology*).

Prólogo

El monitoreo de aguas residuales como herramienta de vigilancia epidemiológica se conoce desde la década de 1940, cuando se usaba para detectar el poliovirus, causante de la poliomielitis, en los Estados Unidos (Paul & Trask, 1941). Debido a que las concentraciones virales pueden variar a través del tiempo, indicando la presencia o ausencia de algún virus, el monitoreo de las aguas residuales puede ser una herramienta con gran potencial para evaluar y mitigar los brotes virales en una comunidad (Farkas et al., 2020).

Ante la irrupción del COVID-19 que generó la más grande pandemia a nivel global de los últimos 100 años el monitoreo del SARS-COV-2 en aguas residuales surge como una alternativa para su detección porque la concentración del material genético del virus en las aguas residuales, se puede identificar incluso, con anterioridad a la sintomatología característica del COVID-19, además con esta información se puede identificar las zonas que albergan mayor o menor cantidad de concentración del virus, así como analizar las tendencias y su evolución.

Es así que en el contexto de emergencia sanitaria por COVID-19, a iniciativa del Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS) se desarrolló la herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo epidemiológico del SARS-COV-2 en aguas residuales, con el apoyo del Programa SECOSAN de la Cooperación Suiza – SECO, y se aplicó en dos ámbitos de estudio (i) Lima Metropolitana y (ii) Arequipa Metropolitana.

El estudio comprendió: (i) la elaboración de un Protocolo para la toma, preservación, transporte, recepción y análisis de las muestras mediante métodos y/o procedimientos que permitieron identificar la concentración de material genético del SARS-CoV-2 en aguas residuales y su validación en campo empleando puntos de monitoreo piloto; (ii) un Plan de Monitoreo; (iii) el monitoreo las aguas residuales de Lima Metropolitana y Arequipa Metropolitana durante 14 meses para determinar la concentración del SARS-COV-2 en los colectores y PTAR seleccionados conforme al Plan de Monitoreo y el Protocolo; (iv) reportes y mapeo de resultados y (v) la Guía Instructiva.

Este documento es la Guía Instructiva para la aplicación de la herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo del SARS-COV-2 en aguas residuales, dirigida a las Empresas Prestadoras de Servicios de Saneamiento (EPS), con el propósito que repliquen este proceso, y que sirva de referencia para otras posibles aplicaciones. La Guía presenta los requisitos y describe los procedimientos con detalle y claridad, para orientar la correcta implementación de esta herramienta. Finalmente, este documento busca servir de base para la instauración de métodos de epidemiología basada en aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés) acordes con las capacidades y el contexto peruano.

Fernando Laca Barrera
Coordinador Técnico SECOSAN

1. Introducción

El monitoreo de aguas residuales como herramienta de vigilancia epidemiológica se conoce desde la década de 1940, cuando se usaba para detectar el poliovirus, causante de la poliomielitis, en los Estados Unidos (Paul & Trask, 1941). Desde entonces, esta herramienta se ha utilizado para monitorear virus entéricos, como norovirus, rotavirus, adenovirus y picornavirus (como los virus de la hepatitis) en diferentes partes del mundo (Asghar et al., 2014; Berchenko et al., 2017; Hellmér et al., 2014); incluso en Latinoamérica (Fumian et al., 2013; Teixeira et al., 2017). Debido a que las concentraciones virales pueden variar a través del tiempo, indicando la presencia o ausencia de algún virus, el monitoreo de las aguas residuales puede ser una herramienta con gran potencial para evaluar y mitigar los brotes virales en una comunidad (Farkas et al., 2020).

La vigilancia epidemiológica a través del monitoreo de aguas residuales aplicada a la detección del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) surge como herramienta para determinar la prevalencia de la COVID-19 en las ciudades; como una estrategia de alerta temprana que permite determinar la presencia o prevalencia del virus en una comunidad de manera anticipada (Mao et al., 2020; Medema, Heijnen, et al., 2020). Reportes publicados al inicio de la pandemia indicaban que el SARS-CoV-2 pudo ser identificado en las aguas residuales días antes de registrarse los primeros casos de la COVID-19 en una población (Mallapaty, 2020).

Es así que la cuantificación y mapeo del SARS-CoV-2 a partir de muestras de aguas residuales se ha realizado en diferentes partes del mundo (Mota et al., 2020). Hasta el momento, existe información sobre la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales de los Países Bajos (Medema, Heijnen, et al., 2020), Estados Unidos (Nemudryi et al., 2020; Peccia et al., 2020), Australia (Ahmed, Angel, et al., 2020), Francia (Wurtzer et al., 2020), España (Randazzo et al., 2020), Italia (La Rosa et al., 2020), Israel (Or et al., 2020), Turquía (Kocamemi et al., 2020), Japón (Haramoto et al., 2020), Brasil (Chernicharo et al., 2020; Prado et al., 2020), Ecuador (Guerrero-Latorre et al., 2020), Argentina (Barril et al., 2020), entre otros.

En el caso de Perú, nuestro país ha sido uno de los más afectados por la COVID-19. El Perú sufrió una de las primeras olas con el mayor exceso de muertes del mundo, para luego transitar una segunda ola, nuevamente de las más mortales del planeta, y actualmente cursando una tercera ola de una magnitud y consecuencias aún difíciles de pronosticar. A nivel nacional, se han estimado más de 180,000 fallecidos entre marzo del 2020 y mayo del 2021 después de haber promediado más de 1000 fallecidos por día en los meses de febrero, marzo y abril, según cifras del Sistema Informático Nacional de Defunciones (SINADEF). Como se ha venido observando en los países en desarrollo con deficientes sistemas de salud, para controlar el impacto de la pandemia se requiere de enfoques e intervenciones novedosas de seguimiento y gestión (Nishi et al., 2020). Estas deben ser flexibles, rentables y escalables, e idealmente deben proporcionar datos completos y objetivos en tiempo real. Precisamente, esto es lo que ofrece la epidemiología basada en aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés), toda vez que esta puede proporcionar una alerta temprana con evaluaciones objetivas y completas, en tiempo real, de la situación actual de la pandemia de la COVID-19 (Mao et al., 2020), entre otras afecciones (Farkas et al., 2020).

En este contexto, el Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), a través de la Dirección de Saneamiento, diseña y presenta la iniciativa “Desarrollo de una herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo de aguas residuales desde el sector saneamiento”, lo cual posibilita el financiamiento de la Cooperación Suiza – SECO, a través del Fondo de Asistencia Técnica (SECOSAN), en el marco del Acuerdo Interinstitucional¹ suscrito con el MVCS.

La ejecución de la consultoría cuenta con la coordinación técnica y supervisión permanente del MVCS y, de acuerdo al Contrato N° 12-2020-SECOSAN, es desarrollado por el Centro de Investigación y Tecnología del Agua (CITA) de la Universidad de Ingeniería y Tecnología – UTEC, en conjunto con el Centro de investigación en Bioingeniería (BIO) de la UTEC y el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología en Plantas Sostenibles de Tratamiento de Aguas Residuales (INCT PTARs Sostenibles) de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG). Para su desarrollo se cuenta con el apoyo de la Empresa Prestadora de Servicios de Agua Potable y Alcantarillado de Lima (SEDAPAL) y la Empresa Prestadora de Servicios de Agua Potable y Alcantarillado de Arequipa (SEDAPAR), y la colaboración de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa (UNSA).

Como parte del servicio de consultoría se elabora la presente Guía Instructiva. Esta tiene el propósito de facilitar la aplicación de la herramienta de alerta temprana para la detección del SARS-CoV-2 mediante el monitoreo de aguas residuales, permitiendo la participación de otros actores y localidades a nivel nacional. Así, en esta guía se presenta el marco conceptual relativo al monitoreo de aguas residuales para la detección de SARS-CoV-2 y otros patógenos; aspectos y requisitos de los laboratorios de análisis; aspectos del protocolo para la toma, preservación, transporte, recepción y métodos de análisis de las muestras en laboratorio; y aspectos requeridos para la elaboración de un plan de monitoreo adecuado. Finalmente, se presentan también aspectos que deben ser considerados para un eficiente registro, procesamiento e interpretación de los resultados para su divulgación, así como recomendaciones derivadas de nuestra experiencia implementando esta herramienta en los ámbitos de Lima Metropolitana, Callao, y Arequipa Metropolitana.

¹ Acuerdo Interinstitucional entre la Confederación Suiza, representada por la Secretaría de Estado para Asuntos Económicos (SECO) y la Agencia Peruana de Cooperación Internacional (APCI), el Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), el Organismo Técnico de la Administración de los Servicios de Saneamiento (OTASS) y la Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS), relativo al “Programa de Apoyo al Fortalecimiento del Sector Agua y Saneamiento (A&S) en el Perú”, suscrito entre las Partes.

2. Objetivos del estudio

2.1. Objetivo General (OG)

Desarrollar una herramienta de alerta temprana que permita conocer la incidencia de la COVID-19 a partir del monitoreo del SARS-CoV-2 en aguas residuales.

2.2. Objetivos Específicos (OE)

- a. Elaborar un Protocolo para la toma, preservación, transporte, recepción y análisis de las muestras mediante métodos y/o procedimientos que permitan identificar la concentración de material genético del SARS-CoV-2 en aguas residuales y su validación en campo empleando puntos de monitoreo piloto.
- b. Realizar el monitoreo de las aguas residuales y determinar la concentración del SARS-COV-2 en los colectores y PTAR seleccionados conforme al Plan de Monitoreo y el Protocolo respectivo.
- c. Elaborar un documento Guía Instructiva para la aplicación de la herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo del SARS-COV-2 en aguas residuales dirigida a las Empresas Prestadoras de Servicios de Saneamiento (EPS), para que repliquen este proceso, y que sirva de referencia para otras posibles aplicaciones.

3. Finalidad

Este documento tiene como finalidad asistir la implementación y ejecución de estrategias de monitoreo de agua residual para la detección del virus SARS-CoV-2 a otros operadores en diversas localidades. En ese sentido, se presentan requisitos y procedimientos descritos con suficiente detalle y simplicidad, para orientar la correcta implementación de esta herramienta. Finalmente, este documento busca servir de base para la instauración de métodos de epidemiología basada en aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés) acordes con las capacidades y el contexto peruano.

4. Alcance

Este documento comprende métodos y procedimientos para la cuantificación del material genético del virus SARS-CoV-2 usando la PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR) en muestras de agua residual obtenidas en colectores y plantas de tratamiento de agua residual (PTARs), ajustados al contexto peruano.

5. Marco conceptual

5.1. Prevalencia del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales

El destino de una gran variedad de virus entéricos ha sido explorado en el ciclo urbano del agua (Mohapatra et al., 2020). Los virus entéricos son aquellos que principalmente infectan y se replican en el tracto gastrointestinal del huésped, principalmente transmitidos por la vía oral-fecal. La presencia de estos virus en las heces y en los sistemas de alcantarillado puede ser determinada con eficacia (Fongaro et al., 2015). Tal es así que el rango de concentración de virus entéricos en heces humanas ha sido estimado entre de 10^3 a 10^{11} copias por gramo de heces, y entre 10^5 a 10^9 copias de genoma por litro de agua residual (Gerba et al., 2018).

El destino de virus entéricos en sistemas de alcantarillado se ha centrado en el estudio de virus no envueltos. Los virus no envueltos son aquellos que consisten únicamente en el material genético viral cubierto con una cápsula proteica. Estos virus son más resistentes a condiciones ambientales adversas que sus contrapartes envueltos (Fong & Lipp, 2005), y son generalmente asociados a enfermedades entéricas. No obstante, se ha demostrado que virus envueltos también pueden encontrarse en los sistemas de aguas residuales y cuerpos de agua naturales (Pinon & Vialette, 2018). Los virus envueltos tienen, además del material genético viral cubierto en una cápsula proteica, una cubierta lipoproteica que los envuelve (Louten, 2016). Estos son más susceptibles a condiciones ambientales adversas, y son típicamente asociados a otras afecciones, como por ejemplo, enfermedades respiratorias (Wigginton et al., 2015; Ye et al., 2016).

Estudios recientes han demostrado que algunos virus envueltos causantes de epidemias, como el SARS-CoV, MERS-CoV y ahora el SARS-CoV-2, típicamente considerados virus respiratorios, también se detectan en el ciclo urbano del agua (Kitajima et al., 2020; Wigginton et al., 2015; Ye et al., 2016). Se ha visto también que, por ejemplo, el virus de la influenza humana (H1N1) puede resistir condiciones adversas en muestras de agua (Dublineau et al., 2011), y que no todos los virus envueltos pierden rápidamente su infectividad cuando se encuentran en muestras ambientales (Polo et al., 2020).

La supervivencia de los virus envueltos en muestras ambientales puede ser influenciada por la temperatura, el pH, la luz solar, la composición de la matriz (p. ej. concentración de materia orgánica), y la presencia de microorganismos antagónicos (Collivignarelli et al., 2020; Mohapatra et al., 2020; Pinon & Vialette, 2018). Mientras que la exposición al sol o luz

ultravioleta y la temperatura superior a 23°C provocan la inactivación del virus, la presencia de materia orgánica puede aumentar su supervivencia al proporcionar una superficie adsorbente (Gundy et al., 2009). Por otro lado, para evaluar la prevalencia de virus envueltos en muestras de agua residual y muestras ambientales se debe tomar en cuenta que los métodos utilizados para la recuperación y concentración de los virus entéricos han sido tradicionalmente optimizados para virus no envueltos. Estos métodos, aplicados al análisis de virus envueltos, pueden subestimar su recuperación y sus tasas de infectividad (Aquino de Carvalho et al., 2017; Gundy et al., 2009; Ye et al., 2016).

Varios estudios han demostrado la presencia del virus SARS-CoV-2 en las heces de pacientes infectados (Collivignarelli et al., 2020; Tian et al., 2020; Wu et al., 2020), tanto en personas sintomáticas, como asintomáticas, con o sin síntomas de diarrea (Wang et al., 2020). También, se ha reportado que el virus SARS-CoV-2 en las heces de pacientes con síntomas puede retener su infectividad (Xiao et al., 2020). Por otro lado, si bien existe consenso en la literatura científica respecto a la presencia del virus SARS-CoV-2 en las heces de personas infectadas, su aparición en la orina no siempre se ha confirmado. Por ejemplo, en un estudio en Francia, se encontró una carga viral de SARS-CoV-2 en heces humanas de 106 - 108 copias por gramo de heces, más no se detectó carga viral en la orina de las personas evaluadas (Lescure et al., 2020). En contraste, un estudio en China indicó la posible presencia de SARS-CoV-2 en la orina en casos de infección grave (Zhang et al., 2020).

Más aún, se ha reportado que el SARS-CoV-2 puede ser detectado en las heces de personas infectadas por largos periodos, hasta 22 días después de los primeros síntomas de la enfermedad, e incluso hasta 26 días después de la recuperación del paciente (Zhang et al., 2020). Varios estudios indican que, si bien la carga viral en el tracto respiratorio tiende a agotarse más rápidamente, el SARS-CoV-2 puede detectarse en las heces de personas infectadas incluso después de períodos prolongados (Lescure et al., 2020). Por ejemplo, Zhang y col. observaron que la duración media de la emisión del SARS-CoV-2 fue de 10 días en hisopados de las vías respiratorias y más de 22 días en las heces (Zhang et al., 2020). Otro estudio por Gupta y col. reportó la presencia de SARS-CoV-2 en las heces hasta 30 días después de la aparición de los primeros síntomas y, en un número bajo de casos, hasta 47 días después (Gupta et al., 2020). Finalmente, en otro estudio por Xiao y col., se detectó el ARN de SARS-CoV-2 en muestras fecales en 17 personas hospitalizadas que dieron negativo en las pruebas de frotis nasofaríngeo (Xiao et al., 2020).

Según lo mencionado previamente queda claro que el SARS-CoV-2 ingresa al sistema de alcantarillado a través de las deposiciones fecales de personas infectadas. Múltiples estudios han confirmado la presencia del virus SARS-CoV-2 en el sistema de alcantarillado en diversos países (Kitajima et al., 2020; Medema, Been, et al., 2020; Mota et al., 2021; Peccia et al., 2020). A pesar de ser un virus envuelto, algunos reportes indican que el virus SARS-CoV-2 puede persistir varios días en el sistema de aguas residuales (Ahmed, Bivins, et al., 2020). Esto es consistente con lo observado para otros coronavirus, como el coronavirus humano (HCoV), que puede persistir hasta 10 días en aguas residuales primarias (luego de la remoción de sólidos) y 5 días en aguas residuales secundarias (luego de tratamiento biológico) en las PTARS (Gundy et al., 2009). Más aún, se ha postulado que el SARS-CoV-2 en las excretas humanas podría pasar al aire durante el transporte por la red de alcantarillado a la PTAR, donde se da la disposición final del agua tratada (Quilliam et al., 2020). No

obstante, Mohapatra y col. (2021), indican que ningún estudio ha concluido aún que se dé la transmisión del SARS-CoV-2 infeccioso desde las plantas de tratamiento de aguas residuales a la población (Mohapatra et al., 2020).

En conclusión, se ha demostrado que el virus SARS-CoV-2 puede llegar a la red de alcantarillado a través de las excretas humanas; aunque, su capacidad de supervivencia e infectividad en las aguas residuales sigue siendo aún muy incierta. Diversos estudios confirman claramente que el virus puede estar presente en las aguas residuales, pero muchos puntos siguen aún por resolver. Por ejemplo, se requiere investigar el impacto de las condiciones externas, como la temperatura, el pH y el tiempo de retención, en la supervivencia del SARS-CoV-2 en el medio acuático (Bivins et al., 2020; Collivignarelli et al., 2020; Mohapatra et al., 2020). Para ello se requiere pruebas que evalúen no sólo su presencia a nivel de ARN, sino también su vitalidad, transmisibilidad, e infectividad, las cuales son aún muy escasas (Elsamadony et al., 2021).

5.2. Detección del virus SARS-CoV-2 por PCR y RT-PCR

A partir de la década de 1980, muchos investigadores comenzaron a utilizar la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés, para detectar secuencias de ácidos nucleicos únicas y específicas de microorganismos en muestras clínicas y muestras ambientales (Maal-Bared et al., 2020). La PCR es una técnica de biología molecular que amplifica, haciendo múltiples copias, un segmento de ADN específico mediante el uso de secuencias de nucleótidos sintéticos cortos llamadas cebadores o *primers* y la enzima ADN polimerasa. Los cebadores detectan y se unen a secuencias únicas en el ADN de la muestra, permitiendo que la enzima ADN polimerasa proceda a hacer una copia de la región flanqueada (por los cebadores). De esta manera, al final de dicha replicación, se obtienen dos copias de ADN a partir de la primera. Este procedimiento de unión de cebadores y síntesis por parte de la ADN polimerasa se conoce como ciclo de PCR. Si se repiten los ciclos uno después del otro, es posible obtener copias del segmento original de ADN de manera exponencial (2, 4, 8, etc.). Al final, se obtienen tantas copias del fragmento que se buscaba detectar, que se pueden observar a simple vista con tinciones especiales, o a través de cámaras especializadas (Joshi & Deshpande, 2010).

Por otro lado, la detección por PCR con transcripción reversa o RT-PCR (por sus siglas en inglés: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), es una variante de la PCR convencional que permite detectar moléculas de ácido ribonucleico o ARN. Además de los ciclos de amplificación mediados por cebadores y la ADN polimerasa, esta técnica incorpora un paso previo de "transcripción reversa" que permite transformar el ARN en la muestra a ADN copia (ADNc), para luego amplificar el ADNc de manera convencional (unión de cebadores y extensión por la ADN polimerasa). Esta técnica de biología molecular permite detectar y aislar ARN de diversas fuentes biológicas, desde el perfil de expresión de genes en células carcinogénicas hasta organismos cuyo genoma se compone de ARN, como algunos virus (Bustin & Mueller, 2005).

Las técnicas PCR cuantitativa o qPCR (*quantitative PCR*) y la PCR cuantitativa con transcripción reversa o RT-qPCR, se basan en las dos previamente descritas, pero incorporan algún compuesto fluorescente que permite medir el incremento en la concentración de moléculas de ADN durante cada ciclo de amplificación en tiempo real. Al medir continuamente el

incremento en la fluorescencia de la reacción se puede determinar la concentración inicial de ADN de cada muestra, siendo esta la principal diferencia y ventaja de la qPCR y la RT-qPCR frente a las anteriores. Específicamente, en el proceso de cuantificación intervienen 2 factores: (1) una curva estándar, constituida por diluciones seriadas de una muestra de ADN que porta la secuencia objetivo y tiene concentración conocida, y (2) un umbral de detección, que se establece preferentemente al inicio de la fase exponencial de amplificación (por arriba de la fluorescencia basal o 'background'). Entonces, para poder cuantificar, se registra el ciclo de amplificación en el que la fluorescencia de la muestra cruza el umbral de detección, conocido como el C_q . La cantidad de fluorescencia está directamente relacionada a la cantidad de ADN en la muestra. Mientras mayor sea la concentración de ADN, mayor será la fluorescencia. Mientras más copias de ADN hay inicialmente en una reacción, más rápido incrementa la fluorescencia en esa reacción, y más rápido se logra cruzar el umbral de detección. Entonces, se tiene que el C_q es menor cuando las muestras tienen una alta concentración inicial del segmento de ADN de interés (se necesitan menos ciclos de PCR para que la fluorescencia aumente y pase el umbral), y el C_q es mayor cuando tienes pocas copias del segmento de ADN de interés (tardas más ciclos en tener suficiente fluorescencia para cruzar el umbral). Luego, con el uso de controles positivos con concentraciones conocidas de las secuencias diana, se puede conocer la concentración inicial del ADN objetivo en la muestra problema interpolando el C_q de la reacción en una curva estándar construida con las concentraciones de las muestras control y el C_q obtenido para cada concentración de la muestra control (Bustin et al., 2009).

El uso de técnicas moleculares para hacer seguimiento de virus ha sido revisado por varios autores (Gerba et al., 2018; Hamza & Bibby, 2019; Haramoto et al., 2018). Dentro de estas técnicas, la PCR es particularmente útil pues permite la detección de virus entéricos humanos en agua ambiental, incluidos aquellos que no pueden detectarse mediante un cultivo celular de rutina (p. ej., norovirus y sapovirus; (Girones et al., 2010)). En el caso del SARS-CoV-2, la RT-qPCR es la técnica que ha sido más utilizada para su detección desde el inicio de la pandemia, tanto en aguas residuales y muestras ambientales, como en muestras clínicas (Kitajima et al., 2020; Medema, Been, et al., 2020; Wu et al., 2020). Adicionalmente a la PCR, la PCR digital o ddPCR (*droplet digital PCR*), una variante de la PCR que involucra el uso de micro gotículas y métodos estadísticos para potenciar la sensibilidad de la reacción. Esta técnica también se ha probado y se ha encontrado que es valiosa, especialmente cuando las cargas virales son más bajas, por ejemplo, durante las primeras etapas de la propagación del virus en la comunidad o cuando este está menguando (Suo et al., 2020).

Aunque son mucho más simples y económicos que el cultivo celular, los métodos moleculares también presentan muchos desafíos. Si bien la RT-PCR se puede utilizar para detectar la presencia de virus de ARN, esta prueba no mide la infectividad ni la viabilidad del virus (Haramoto et al., 2018; Mohapatra et al., 2020). Si bien, con el uso de controles positivos con concentraciones conocidas del virus diana, la intensidad de la fluorescencia se puede utilizar para propósitos de cuantificación (Bustin et al., 2009); metodológicamente, el grado de sensibilidad y la especificidad logradas por la RT-PCR dependen tanto de la eficacia de la recuperación de virus a partir de las muestras, mediante procesos de concentración y purificación, y el grado final de pureza del genoma viral recuperado mediante la eliminación de sustancias inhibitoras de la PCR (Haramoto et al., 2018; Metcalf et al., 1995).

Otro desafío de los métodos moleculares es la traducción de los resultados de las pruebas de ácido nucleico (copias de genoma viral) a estimaciones del nivel de riesgo para la salud pública. No todos los virus patógenos detectados en el entorno utilizando métodos moleculares son infecciosos, siendo que podrían estar en estado "inerte" (Prussin et al., 2020). Los resultados de las pruebas basadas en ácidos nucleicos son una expresión del material genético total del virus presente, sin discriminar entre partículas infecciosas y no infecciosas (Haramoto et al., 2018; Mohapatra et al., 2020). La PCR no puede medir hasta qué punto un virus es inactivado por diferentes desinfectantes (Haramoto et al., 2018). Esto se debe a que el objetivo de la PCR es detectar partes o fragmentos específicos del ARN y no toma en cuenta el tipo ni la gravedad del daño causado a la cápside del virus o a su genoma por los desinfectantes (Torrey et al., 2019). En consecuencia, un resultado de cultivo celular negativo (es decir, pérdida de infectividad) no siempre se asocia con una PCR de resultado negativo (Prevost et al., 2016). Sin embargo, un resultado de PCR negativo sí indica pérdida de actividad y eliminación de riesgos (Nuanualsuwan & Cliver, 2002). Finalmente, un resultado positivo de PCR no proporciona evidencia de riesgo para la salud pública por virus infecciosos (Metcalf et al., 1995; Sinclair et al., 2008) o fracaso del tratamiento de depuración (Torrey et al., 2019) y, por lo tanto, no es, de forma independiente, una causa para iniciar alguna acción por parte de los servicios públicos o las agencias regulatorias.

De cualquier manera, la presencia de SARS-CoV-2 en muestras humanas se puede confirmar mediante la detección de secuencias de ARN virales específicas - exclusivas del SARS-CoV-2 - mediante la RT-PCR (Foladori et al., 2020). Los genes virales analizados incluyen el gen "N" de la proteína de la nucleocápside, el gen "E" de la proteína de la envoltura, el gen "S" de la proteína espiga y el gen "RdRP" de la ARN polimerasa dependiente de ARN (también reportado como Orf1ab). La OMS ha aprobado recientemente genes diana del SARS-CoV-2 específicamente para la detección del virus en muestras ambientales que incluyen los genes de la nucleocápside (N1, N2, y N3) y los genes que codifican las proteínas de las espigas (S) (Centers for Disease Control and Prevention, 2020).

La cuantificación precisa del SARS-CoV-2 en muestras ambientales requiere el uso de cebadores y sondas adecuadas, así como controles (positivos y negativos) y réplicas de análisis (p. ej. en triplicado) para minimizar el error experimental (Mohapatra et al., 2020). Controles positivos pueden ser plásmidos que contienen el gen completo de la nucleocápside del SARS-CoV-2. Otros controles incluyen virus endógenos, asociados a excretas de humanos, que suelen estar presentes en el agua residual, como el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) (Kitajima et al., 2018). Luego, el número de copias de ARN del SARS-CoV-2, normalmente expresado como partículas/mL o copias de genoma/mL, se estima de los valores de C_q registrados para cada muestra, como se explicó anteriormente, los que están inversamente relacionados con la carga viral.

Para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales se realizan etapas de pretratamiento, para purificar y/o concentrar el virus y así mejorar la eficacia de detección (Foladori et al., 2020; Lu et al., 2020). Si bien se ha avanzado mucho en la optimización de métodos para medir SARS-CoV-2 en muestras ambientales, aún no se cuenta con un protocolo estándar, consensuado, para su aplicación. Alternativamente, Ahmed y col. (2020) evaluaron la identificación del SARS-CoV-2 mediante amplificación por PCR, seguida por su purificación

y secuenciación mediante el método de Sanger, para luego realizar análisis filogenéticos (Ahmed, Bivins, et al., 2020). También, es posible analizar diferentes muestras usando secuenciación de alto rendimiento (HTS), seguido por el emparejamiento y alineamiento con cepas de referencia de SAR-CoV-2 utilizando herramientas bioinformáticas. Este enfoque, conocido como secuenciación metatranscriptómica, a partir del agua residual, permite comprender el origen y la prevalencia de nuevas variantes del SARS-CoV-2 con un enfoque espacio-temporal (Crits-Christoph et al., 2021).

De cualquier manera, los CDC recomiendan que el aislamiento, la inactivación y los cultivos de virus se realicen en un laboratorio con nivel de bioseguridad 3 (BSL-3), mientras que las pruebas de diagnóstico de rutina se pueden realizar en un laboratorio con nivel de bioseguridad 2 (BSL-2) (Sick, 2020).

5.3. Epidemiología basada en aguas residuales aplicada a la detección de SARS-CoV-2

La epidemiología basada en aguas residuales (WBE por sus siglas en inglés: *Wastewater Based Epidemiology*) es una nueva herramienta epidemiológica muy potente, que puede complementar información del sector salud para el monitoreo de brotes de enfermedades y otras afecciones. La WBE fue inicialmente conceptualizada por Daughton en el 2001, como herramienta para monitorear tráfico de drogas ilícitas en una población (Daughton, 2001). Esta estrategia fue luego implementada para rastrear el uso de cocaína y otras drogas ilegales en aguas superficiales y aguas residuales (Zuccato et al., 2008; Zuccato et al., 2005), para el análisis de isoprostanos (indicadores de estrés oxidativo sistémico) en muestras de agua residual (Daughton, 2012), para el análisis de oseltamivir (Tamiflu) durante la pandemia de influenza del 2009 (Singer et al., 2012), entre otras aplicaciones.

El concepto detrás de WBE es poder detectar diferentes compuestos químicos y/o biológicos, conocidos como biomarcadores, que estén presentes y sean estables en el agua residual, y que otorguen información sobre los hábitos de vida y/o el estado de salud de la comunidad a la cual corresponden (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Algunos biomarcadores comúnmente analizados a través de WBE incluyen (1) organismos patógenos; (2) biomarcadores asociados a respuestas fisiológicas, conocidos como biomarcadores endógenos, que pueden ser pequeños metabolitos o proteínas; (3) marcadores relacionados a alguna intervención farmacológica o consumo de drogas, y (4) marcadores relacionados a resistencia antimicrobiana (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020).

La data proporcionada por la WBE puede ser utilizada para la vigilancia ambiental de la prevalencia de una infección viral, como se ha reportado previamente con poliovirus (Berchenko et al., 2017). A diferencia de otros microorganismos, los virus no crecen fuera de las células huésped. Por lo tanto, los virus humanos en las aguas residuales pueden representar las concentraciones excretadas por la población correspondiente, siempre que persistan el tiempo suficiente, sea 2 a 4 días, para poder ser detectados (Annalaura et al., 2020; Kitajima et al., 2020). Así, monitoreando los cambios en la concentración viral en el agua residual, se puede determinar la prevalencia de la enfermedad en la comunidad, junto con la detección temprana de nuevos brotes virales patogénicos para el ser humano (Adriaenssens et al., 2018; Ahmed, Bivins, et al., 2020; Daughton, 2020).

La principal ventaja de la WBE es que puede proporcionar información más extensiva, con menos sesgos (p. ej. acceso a sistemas de salud o pruebas de diagnóstico), en tiempo real, y con resolución espacio-temporal, sobre la presencia de algún biomarcador de interés en la comunidad (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Es así, que su utilidad para la vigilancia epidemiológica se ha demostrado previamente. Por ejemplo, durante el programa de la erradicación mundial de la polio, se utilizó la WBE para evaluar la circulación de la poliomielitis dentro de las poblaciones y la eficacia del efecto de inmunización contra el poliovirus (Hovi et al., 2012). También, se ha utilizado la WBE en la predicción retrospectiva de brotes de enfermedades de hepatitis A y de gastroenteritis asociadas a norovirus (Hellmér et al., 2014). A pesar de estos ejemplos exitosos, la WBE aún no se aplica de manera sistemática para evaluar y predecir brotes de enfermedades virales.

En el caso de la COVID-19, la WBE podría resolver ciertas limitaciones en los sistemas de vigilancia existentes que se han destacado durante esta pandemia; así como previamente, en la pandemia de influenza A del 2009 (Dawood et al., 2012). Específicamente, limitaciones relacionadas a la sensibilidad y especificidad de los enfoques de vigilancia sindrómica², pues esta depende en gran medida del reporte y gravedad de los síntomas clínicos y en qué medida estos se superponen con enfermedades ya existentes en la población. En el caso del SARS-CoV-2, una proporción significativa de los pacientes son asintomáticos, presintomáticos o experimentan síntomas leves, inespecíficos y, por lo tanto, no son reportados, resultando en una considerable subestimación de la prevalencia de casos de infección. Más aún, en algunos estudios, se ha estimado que la tasa de infección asintomática es alrededor de 20-45% (Mizumoto et al., 2020). Por otro lado, mientras que la vigilancia sindrómica basada en las admisiones hospitalarias podría ser más específica, estas estimaciones representan un retraso de días a semanas entre la infección y la admisión al centro de salud.

Alternativamente, se propone que el uso masivo de pruebas diagnósticas constituye la herramienta más precisa para medir la transmisión activa y la prevalencia de enfermedades. Sin embargo, la escala espacial y temporal de las pruebas necesarias para lograr la penetrancia adecuada para recopilar información no es práctica o es muy costosa para la mayoría de los países (Daughton, 2020). Incluso, se requerirían pruebas repetidas para asegurar un control efectivo de la enfermedad. Diagnósticos rápidos y novedosos pueden ser útiles a este respecto, pero aún no están disponibles y presentan sus propios desafíos en cuanto a fiabilidad y control de calidad. Por lo tanto, se requieren estrategias que otorguen una medida de la infección en la población que sea más sensible, específica y oportuna (Daughton, 2020).

En este contexto, la información biológica que contienen las aguas residuales puede ser utilizada como un sistema de vigilancia imparcial y reflejar la salud de la comunidad. Los virus humanos en las aguas residuales son biomarcadores biológicos de su propia circulación en poblaciones (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Su detección en el sistema de alcantarillado puede sugerir su origen humano y, por lo tanto, qué enfermedades están circulando dentro de una población en casi tiempo real. La WBE es escalable y rentable, incluso en entornos de bajos recursos; proporciona resultados rápidos, y puede monitorear una amplia variedad de enfermedades virales emergentes y reemergentes y/o patógenos importados (Medema, Been, et al., 2020; Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Además, el paso de las aguas residuales a PTARs centralizadas en la mayoría de los centros urbanos (donde el SARS-CoV-2 es más prevalente) permite capturar la carga viral de 104 a 106 individuos en una sola

² Que analiza datos clínicos sin confirmación diagnóstica estándar.

muestra, lo que facilita el análisis de toda la comunidad (Polo et al., 2020). Finalmente, una diferencia importante entre la WBE y las pruebas de diagnóstico masivo es que el sesgo de autoselección no jugaría un papel en la WBE (Daughton, 2020).

No obstante, los principales retos para aplicar la WBE de manera amplia y sistemática incluyen: (1) la concentración del biomarcador, que debe estar presente en cantidad suficiente para poder ser detectado con los métodos analíticos disponibles; (2) la complejidad de la matriz, que muchas veces dificulta la purificación del biomarcador con suficiente grado de pureza que permita un análisis confiable (p. ej. presencia de inhibidores); y, (3) la estimación del tamaño de la población contribuyente, sobre todo en poblados con una alta tasa de migración y/o actividad turística (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Este último factor es crítico, y puede ser controlado parcialmente utilizando la información censal más reciente, y estimando parámetros hidroquímicos tales como la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda biológica de oxígeno (DBO) o la concentración de amonio (NH₄⁺) (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Existen otros biomarcadores poblacionales como la creatinina, el colesterol, el coprostanol, entre otros (Polo et al., 2020); o el mismo ADN humano, y otros virus asociados a humanos como el crAssphage, virus del mosaico leve de la pimienta y adenovirus (Farkas et al., 2019), pero todos estos biomarcadores no son ampliamente usados ya sea por dificultad de análisis, por su estabilidad o por su variabilidad y/o falta de información sobre su correspondencia con una cantidad de población dada (Rico et al., 2017).

Finalmente, Polo y col. (2020) resaltan que el objetivo final de la WBE es establecer correlaciones y comparaciones entre las concentraciones virales medidas en las aguas residuales y los casos clínicos notificados de enfermedad o la extensión del brote en la población (Polo et al., 2020). Estas correlaciones pueden servir como validación para un modelo de predicción que tenga en cuenta los factores que pueden impactar la tasa de eliminación de virus en las heces, incluida la viremia, la duración, gravedad y etapa de la enfermedad (C. Chen et al., 2020; N. Chen et al., 2020). De esa manera, se generaría evidencia para sustentar que los cambios en las concentraciones virales en las aguas residuales indican cambios en los casos de enfermedades en la población humana (Polo et al., 2020). Adicionalmente, la normalización de la población es fundamental para permitir comparaciones entre ciudades, o incluso zonas más acotadas dentro de una misma ciudad, y para garantizar que un aumento significativo de la concentración viral en una muestra de aguas residuales no corresponda a un aumento de la población en el área atendida (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). En este sentido, las fluctuaciones en la población representan un desafío. Si bien estas dinámicas pueden tener un impacto insignificante en los niveles de biomarcadores en poblaciones grandes, podrían contribuir a mayores incertidumbres en poblaciones más pequeñas (Chen et al., 2014). Así mismo, el seguimiento de las aguas residuales vertidas en los aeropuertos y puertos marítimos internacionales puede permitir detectar muy pronto la entrada del virus en un país (Ahmed, Angel, et al., 2020). Toda esta información puede ayudar a las autoridades pertinentes a decidir la implementación o eliminación de cuarentenas y/o cercos epidemiológicos (Lesimple et al., 2020; Medema, Been, et al., 2020). A su vez, la WBE puede ser una gran alternativa como complemento de herramienta para la vigilancia, que permite la identificación de puntos críticos (*hotspots*) para las clásicas intervenciones adicionales de vigilancia (Gonzalez et al., 2020; Mota et al., 2021; Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020), resultando en un enfoque útil para monitorear esta dinámica y orientar la toma de decisiones sobre cuarentenas/distanciamiento social y la focalización de recursos (Medema, Been, et al., 2020).

6. Aspectos y requisitos del laboratorio

6.1. Requisitos mínimos generales

El monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales se realiza en 3 etapas:

- (1) **trabajo de campo**, mediante el cual se realiza la toma de las muestras, las que se transportan de manera óptima al laboratorio;
- (2) **trabajo de laboratorio**, que incluye la preparación de todo el material y la realización de las pruebas de detección per se; y
- (3) **trabajo de gabinete**, que consiste en revisar los resultados provistos por el laboratorio y cotejarlos con la información obtenida del sector salud, información poblacional, normativa vigente, información meteorológica, entre otra; para contextualizar e interpretar los resultados y emitir los reportes.

Requisitos mínimos generales para cada una de estas actividades incluyen:

a. Requisitos mínimos para el trabajo de campo:

- Conocimiento general sobre el funcionamiento y diseño de los sistemas de alcantarillado y plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs).
- Tener acceso a mapas de diseño de la red de alcantarillado, idealmente en GIS.
- Tener acceso físico a la red de alcantarillado y PTARs para la toma de muestras.
- Tener seguro contra todo riesgo (SCTR) e implementos de protección personal (ver tabla 2).

b. Requisitos mínimos para el trabajo de laboratorio:

- Contar con un laboratorio con nivel de bioseguridad 2 (BSL2) o “Con medidas de control reforzadas” (Kojima et al., 2020). Este es el nivel pertinente a los laboratorios que manejan materiales que pueden presentar riesgo moderado para el personal y el medio ambiente. Los responsables de implementar los análisis de laboratorio deben estar familiarizados con las pautas y procedimientos descritos en el Manual de Bioseguridad para Laboratorios (Kojima et al., 2020) emitido por la Organización Mundial de la Salud, disponible en este enlace: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>.
- Garantizar un flujo unidireccional en la ejecución de los ensayos, desde la recepción de la muestra hasta la emisión de los resultados. Este requisito es crítico, para disminuir el riesgo de contaminación cruzada en la ejecución de los ensayos.

Para facilitar el diseño de los laboratorios, con miras a lograr un flujo unidireccional en los ensayos, se definen distintos procesos de laboratorio (PL), según:

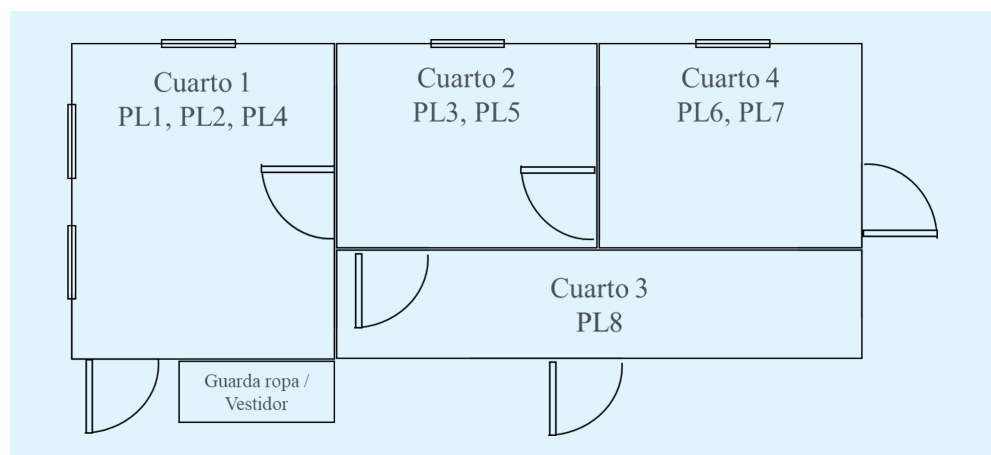
- PL1. Recepción y almacenamiento de las muestras sin filtrar.
- PL2. Preparación de materiales para el trabajo de campo.
- PL3. Filtración de las muestras.
- PL4. Esterilización y lavado de material contaminado.
- PL5. Purificación de ácidos nucleicos.
- PL6. Amplificación de ácidos nucleicos.
- PL7. Preparación de controles positivos.
- PL8. Preparación de materiales limpios.

Estos procesos deben realizarse en zonas o ambientes claramente separados pero contiguos, según:

- **Cuarto 1:** Pueden realizarse en este ambiente PL1, PL2 y PL4.
- **Cuarto 2:** Pueden realizarse en este ambiente PL3 y PL5. Se puede compartir una misma cabina de bioseguridad clase 2A para ambos procesos siempre que se limpie y esterilice bien entre los pasos de filtración y purificación. Por ejemplo, se puede filtrar muestras por la tarde, limpiar y esterilizar la cabina, y purificar ácidos nucleicos por la mañana.
- **Cuarto 3:** Puede realizarse en este ambiente PL8. Se sugiere que se almacene en este ambiente todos los reactivos y materiales limpios para los ensayos. **No se debe guardar o manipular muestras o material que haya estado en contacto con la muestra en este ambiente.**
- **Cuarto 4:** Puede realizarse en este ambiente PL6 y PL7 siempre y cuando estas tareas se realicen en cabinas de contención distintas. **No se debe usar la misma cabina de contención para preparar los controles positivos y las reacciones de RT-qPCR. Nunca, bajo ninguna circunstancia, se debe abrir un producto de PCR en este espacio.**

Un plano sugerido se presenta en la Figura 1.

Figura 1. Esquema sugerido para la organización del laboratorio de detección de SARS-CoV-2 en agua residual.



c. Requisitos mínimos para el trabajo de gabinete:

- Conocimiento general sobre manejo de datos y uso de plataformas informáticas.
- Equipos de cómputo.

6.2. Consideraciones del equipamiento del laboratorio especializado

El equipamiento requerido para cada etapa del análisis de SARS-CoV-2 en muestras de agua residual es el siguiente:

a. Equipamiento requerido para la preparación de materiales para los ensayos (PL8)

- **Sistema para obtener agua destilada o tipo III** (ver Tabla 1): Usada para enjuagar todos los utensilios de trabajo.
- **Sistema para obtener agua tipo I** (ver Tabla 1) (p. ej, sistemas Millipore): Usada para la dilución de ácidos nucleicos.
- **Autoclave:** Equipo empleado en la esterilización de material para biología molecular.
- **Horno 250 °C:** Se emplea para el tratamiento por calor de los utensilios empleados en la manipulación de las muestras.

Tabla 1. Especificaciones estándar para el agua usada en laboratorios de ensayo.
Fuente (ASTM) D1193-91 Sociedad Americana de Pruebas y Materiales.

Parámetro	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
Conductividad eléctrica Max. ($\mu\text{S}/\text{cm}$ @ 25°C)	0,056	1,0	4,0	5,0
Resistividad eléctrica Min. ($\text{M}\Omega\text{-cm}$ @ 25°C)	18,2	1,0	0,25	0,2
pH a 25°C	-	-	-	5,0 - 8,0
Carbono orgánico total máx. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	10	50	200	Sin límite
Sodio máx. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	1	5	10	50
Sílice máx. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	3	3	500	Sin límite
Cloro máx. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	1	5	10	50

b. Equipamiento requerido para la concentración de partículas virales en muestra de agua residual (PL3)

- **Cabina de Bioseguridad Clase 2A:** Equipo utilizado para trabajo en esterilidad, para evitar la contaminación cruzada con otro material biológico, y para proteger al analista de riesgo biológico.
- **Refrigerador de 4 °C +/- 3°C:** Se emplea para la conservación de las muestras de aguas residuales provenientes de colectas de campo.

- **Bomba de vacío:** Se emplea para filtrar la muestra empleando vacío (60 psi).
- **Agitador magnético:** Requerido para homogeneizar las muestras de agua residual con sales agregadas para el proceso de filtración.
- **Micropipeta de 1000 mL:** Requerida para adicionar el control de recuperación a las muestras de agua residual.
- **Lámparas de luz ultravioleta:** Sistema de esterilización ambiental de luz ultravioleta de las cabinas o estaciones de trabajo. Garantiza la ausencia de contaminación cruzada o contaminación ambiental durante los procesos de filtración.

c. Equipamiento requerido para la purificación del material genético viral (ARN) (PL5)

- **Cabina de Bioseguridad Clase 2A:** Equipo utilizado para trabajo en esterilidad, para evitar la contaminación cruzada con otro material biológico, y para proteger al analista de riesgo biológico.
- **Micropipetas:** Instrumento para la mezcla de micro volúmenes empleados en los ensayos. Se requiere un set de micropipetas para cubrir un rango de volúmenes de 0.5 µL hasta 1000 µL.
- **Microcentrifuga:** Se emplea para la separación de fases en la purificación de ARN, en rango de hasta 14000 r.p.m. El equipo puede proveer refrigeración de la muestra (4 °C).
- **Nanodrop:** Espectrofotómetro para la cuantificación de micro-volúmenes de las preparaciones de ARN. Determina la cantidad y calidad de ARN obtenido en la purificación.
- **Qubit Fluorometer:** Método alternativo, bastante sensible y específico, para cuantificar muestras de ácidos nucleicos.
- **Incubadora de microtubos:** Se utiliza para incubar los tubos de microcentrifuga a temperatura controlada, requerido para algunos pasos durante la purificación de ARN.
- **Vortex Mixer:** Se emplea para mezclar las reacciones de extracción, durante la purificación de ARN.

d. Equipamiento requerido para las reacciones de RT-qPCR (PL6)

- **Termociclador de tiempo real (p. ej. 7500 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems):** Equipo para la amplificación y cuantificación de ácido nucleicos.
- **Congelador de 4 °C y -20 °C:** Se emplea para conservación a corto plazo de las muestras de ARN y reactivos para la cuantificación por PCR (RT-qPCR).
- **Ultracongeladora -80 °C:** Se emplea para la conservación a largo plazo de las muestras de ARN.
- **Vortex Mixer:** Se emplea para mezclar bien los tubos con las reacciones y con los reactivos.
- **MiniSpin (Microcentrifuga) para tubos de 1,5 mL:** Se emplea para sedimentar aerosoles en los tubos de reacción y reactivos.
- **Centrífuga para microplacas:** Se emplea para sedimentar aerosoles dentro de la placa de reacción de PCR.

- **Cabina de contención para PCR:** Equipo que proporciona un ambiente controlado, que impide que entre o salga cualquier aerosol que pueda contaminar las muestras, que además cuenta con luz UV-C para descontaminar la superficie de trabajo. Se requiere al menos 2 para los ensayos, una para la preparación de los controles positivos y otra para la preparación de las reacciones de RT-qPCR.

Importante: No se debe movilizar los utensilios designados para cada proceso de laboratorio entre los espacios designados. Cada área debe contar con todo el equipamiento requerido indicado en esta Guía. Por ejemplo, no se deben mover las micropipetas de la zona de purificación de ARN, a la zona de preparación de reacciones de PCR, y viceversa.

6.3. Consideraciones del personal requerido.

a. Personal requerido para el trabajo de campo.

- **Jefe del trabajo de campo:** Se requiere un especialista en ingeniería sanitaria, ingeniería civil o ingeniería ambiental, que conozca procesos relacionados al monitoreo en redes de alcantarillado y tratamiento de aguas residuales. Es ideal que esté familiarizado con conceptos de ingeniería hidráulica, así como con el uso de Sistemas de Información Geográfica (GIS). Su función es seleccionar y coordinar la toma de muestras en buzones y en plantas de tratamiento de aguas residuales. Debe supervisar que se cuente con todo el material de campo requerido. Debe coordinar estrechamente con las EPSs y el MVCS.
- **Operario:** No se requiere personal con entrenamiento especializado previo para esta función. Sus responsabilidades incluyen desinfectar los frascos donde se recoge la muestra, recoger el material para la toma de muestra preparado en el laboratorio especializado, ejecutar la toma de muestra en campo, registrar parámetros de campo, transportar la muestra al laboratorio, y llenar la cadena de custodia.

b. Personal requerido para el trabajo de laboratorio

- **Jefe de laboratorio:** Debe tener entrenamiento especializado en biología molecular, sea a nivel de pregrado o posgrado. Debe estar familiarizado con pruebas para la purificación y amplificación de ácidos nucleicos, así como conocimientos básicos de bioquímica y microbiología. Es responsable de supervisar el trabajo de laboratorio, y emitir opiniones e interpretaciones de los resultados. También, el jefe de laboratorio será responsable de los suministros y logística requeridos para los ensayos.
- **Analista de laboratorio:** Puede ser un profesional con grado técnico o universitario, con experiencia trabajando en laboratorios relacionados a ciencias de la vida. Será entrenado por el jefe de laboratorio para la ejecución de las pruebas.
- **Asistente de laboratorio:** No requiere entrenamiento especializado previo. Será responsable de asistir al analista y al personal de campo con la limpieza y preparación de todos los materiales requeridos.

c. Personal requerido para el trabajo en gabinete

- **Analista de datos:** Se requiere de un profesional entrenado en biología, epidemiología, o ciencias médicas. Será responsable de resumir la información proporcionada por el jefe de laboratorio, descargar indicadores del sector salud, coleccionar la información poblacional provista por el jefe de campo, obtener información meteorológica y combinar toda esta información en informes y reportes. Es ideal que esta persona tenga conocimientos de R Studio, u otros softwares que permitan procesar datos. Si se espera diseñar planes de monitoreo en gabinete, es importante que esta persona tenga conocimientos de GIS, y/o que trabaje estrechamente con el jefe de trabajo de campo para el análisis de la red de alcantarillado a ser monitoreada.

6.4. Otros insumos y materiales necesarios.

a. Materiales requeridos para el trabajo de campo (Tabla 2).

Tabla 2. Materiales y equipos requeridos para la colecta de muestras de agua residual en colectores y plantas de tratamiento (PTARs).

Descripción	Cantidad	Tipo de punto de monitoreo
Materiales		
Papel secante	01 por punto de monitoreo	Colectores
Cinta adhesiva	01 por punto de monitoreo	Colectores
Plumón indeleble	01 por punto de monitoreo	Colectores y PTARs
Frascos de plástico limpios de 250 mL	06 por punto de monitoreo	Colectores
Frascos de plástico limpios de 1000 mL	01 por punto de monitoreo	Colectores y PTARs
Frasco de vidrio estéril de 500 mL	01 por punto de monitoreo	Colectores
Frasco de plástico limpio de 250 mL con gotas de H ₂ SO ₄ (1N)	01 por punto de monitoreo	Colectores
Bolsa de primer uso	04 por punto de monitoreo	Colectores y PTARs
Cajas térmicas (coolers)	01 por punto de monitoreo	Colectores y PTARs
Ice packs medianos	20 por caja térmica ³	Colectores
Agua destilada	01 litro por punto de muestreo	Colectores
Agua potable	06 litros por punto de monitoreo	Colectores
Detergente	50 g por punto de monitoreo	Colectores
Piseta	01 por punto de monitoreo	Colectores
Vaso de precipitados de 500 mL de plástico	01 por punto de muestreo	Colectores
Cinta métrica	01 por punto de monitoreo	Colectores
Soga	01 por punto de monitoreo	Colectores
Balde grande (aprox. 5 litros)	02 por punto de monitoreo	Colectores
Balde pequeño (aprox. 2 litros)	01 por punto de monitoreo	Colectores
Alcohol 70% (v/v)	500 mL punto de monitoreo	Colectores

³ Mínimo requerido para una colecta de muestra compuesta de 4 horas.

Equipamiento		
GPS	01 por punto de monitoreo	Colectores
Multiparámetro portátil ⁴	01 por punto de monitoreo	Colectores
Plumón indeleble	01 por punto de monitoreo	Colectores
Cámara fotográfica	06 por punto de monitoreo	Colectores y PTARs
Termohigrómetro	01 por caja térmica	Colectores y PTARs
Equipo de protección personal (EPP)		
Chaleco refractario	01 por personal	Colectores y PTARs
Botas de seguridad (antideslizantes)	01 par por personal	Colectores y PTARs
Gafas de seguridad	01 par por personal	Colectores
Casco	01 por personal	Colectores y PTARs
Guantes de nitrilo	02 pares por personal	Colectores y PTARs
Guantes de jebe	01 par por personal	Colectores
Mascara anti gases	01 por personal	Colectores
Cinta métrica	01 por personal	Colectores
Formatos		
Ficha de campo	01 por punto de monitoreo	Colectores y PTARs

b. Materiales requeridos para el trabajo de laboratorio (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 3. Materiales y reactivos requeridos para el trabajo de laboratorio.

Descripción	Clase / Marca
Filtración de las muestras	
Mameluco impermeable ⁵	p. ej., RDL Professional cat. no. MF-170-P
Guantes de nitrilo sin polvo	Genérico
Gorro o toca descartable	Genérico
Protector de calzado descartable	Genérico
Mascarilla KN95	Genérico
Protector facial de acrílico	Genérico
Sistema de filtración de vidrio borosilicato para membrana (matraz, abrazadera, vaso colector, porta filtro) de 1000 mL	p. ej., IsoLab, Cat. No. 043.03.001
Probetas de vidrio borosilicato de 25 mL, 100 mL y 250 mL.	Genérico
Beakers de vidrio borosilicato 250 mL	Genérico
Pinzas metálicas planas para manipular filtros de membrana	Genérico
Jeringa descartable de 5 mL estéril	Genérico
Solución de cloruro de magnesio (MgCl ₂) 2.5 M	Grado analítico (p. ej., Himedia, Cat. No. GRM728-500G)
Ácido acético 1M	Grado analítico (p. ej., Merck Cat No. 100063)
Membranas de ésteres mixtos de celulosa con poro de 0,45µm, y diámetro de 47mm	MERCK, Cat. No. HAWP04700
Tiras de papel indicador de pH	Genérico, para uso en laboratorio
Bead tubes type "A"	Macherey-Nagel, Cat. No. 740786.50

⁴ Medidor portátil Ph/Cond/TDS/SAL/Temp Mod:7200 – EZODO.

⁵ Se usa de 3 -6 veces, es irradiando con luz UV-C después de cada uso dentro de la cámara de preprocesamiento de muestras.

Purificación de ácidos nucleicos	
Mandil de laboratorio con manga larga descartable	Genérico
Guantes de nitrilo sin polvo	Genérico
Gorro o toca descartable	Genérico
Protector de calzado descartable	Genérico
Mascarilla KN95	Genérico
Gafas de laboratorio de acrílico	Genérico
Racks para microtubos de 1.5 mL y 2 mL	Genéricos
Cubeta para contener hielo	Genérico ⁶
NucleoSpin RNA Stool Kit	Macherey-Nagel, Cat. No.740130.50
Agua libre de nucleasas	Invitrogen, Cat. No. 10977015
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific Cat. No. 15596026
RNAse Away	Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 10328011
Cloroformo	Merck, Cat. No. 496189-1L
Tubos de microcentrífuga libres de nucleasas de 1.5 mL y 2.0 mL	p. ej., Axygen, Cat. No. MCT-150-C-1u y MCT-200-C-1u
Puntas de micropipeta con filtro	p. ej., Axygen, Cat. No. TF-1000-1u, TF-200-1u, TF-100-1u, TF-20-1u, TF-300-1u
Ensayos de PCR (RT-qPCR)	
Mandil quirúrgico no estéril de manga larga descartable	Genéricos
Guantes de nitrilo sin polvo	Genéricos
Gorro o toca descartable	Genéricos
Protector de calzado descartable	Genéricos
Mascarilla KN95	Genéricos
Gafas de laboratorio de acrílico	Genéricos
Agua Libre de Nucleasas (Nuclease-free water)	Invitrogen, Cat. No. 10977015
RNAse Away™	Thermo Scientific; Cat. No. TS 7000PK
Microplaca para qPCR de 96 pocillos ⁷	Applied Biosystem, Cat. No. 4346907
MicroAmp Optical Adhesive Film PCR / Real time PCR ⁵	Applied Biosystem, Cat. N° 4311971
Tubos de microcentrífuga libres de nucleasas de 1.5 mL	p. ej. Axygen, Cat. No. MCT-150-C-1u y MCT-200-C-1u
Puntas con filtro estériles, libres de nucleasas para micropipetas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL.	p. ej., Axygen, Cat. No. TF-1000-1u, TF-200-1u, TF-100-1u, TF-20-1u, TF-300-1u
Cebadores, sondas, controles y kits para RT-qPCR	Ver Tabla 4

⁶ Se debe poder desinfectar con solución de lejía 1% v/v.

⁷ Debe ser de una marca y modelo compatible con el equipo termociclador de tiempo real disponible en el laboratorio. Consulte compatibilidad con su proveedor.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la determinación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. NA, no aplica.

Descripción	Empresa/Marca	No Catálogo	Parámetro
G-Block Sketa22, y set de cebadores y sonda	IDT	NA (ver secuencias en Anexo 3)	Secuencia de ADN de Salmón (<i>Oncorhynchus keta</i>) de 77 pares de bases correspondiente al gen ITS de la región 5.8S para ser usado como control de inhibición, junto con los cebadores y sonda específicos para este target.
G-Block BRSV_Ngene, y set de cebadores y sonda	IDT	NA (ver secuencias en Anexo 3)	Secuencia de ADN del gen N del Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) de 124 pares de bases usado como control de recuperación, junto con los cebadores y sonda específicos para este target.
G-Block PMMoV-16.9, y set de cebadores y sonda	IDT	NA (ver secuencias en Anexo 3)	Secuencia de ADN del gen CP del Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) de 70 pares de bases usado como control endógeno, junto con los cebadores y sonda específicos para este target.
BOVILIS® VISTA ONCE SQ	IDT	07213146169-02	Vacuna multivalente que contiene virus atenuados de BRSV para ser usado como control de recuperación.
2019-nCoV RUO Kit	IDT	10006605 10006713	Kit que contiene 3 soluciones premezcladas de cebadores y sonda correspondientes para 2 pruebas específicas para SARS-CoV-2 (regiones N1 y N2 determinadas por los CDC) y 1 control interno humano (RPP30).
2019-nCoV_N_Positive Control	IDT	10006625	Plásmido que contiene la secuencia completa del gen de la nucleocápside del virus 2019-nCoV, con las regiones N1, N2 y N3
Hs_RPP30 Positive Control	IDT	10006626	Plásmido que contiene la secuencia completa del gen humano RPP30 que contiene las regiones analizadas por el kit 2019-nCoV RUO.
Itaq Universal Sondas One Step Kit	BioRad	1725141	Master Mix utilizado para las reacciones qPCR, tiene todos los reactivos necesarios y la enzima transcriptasa inversa para promover la transcripción en un solo paso.

7. Aspectos del protocolo para la toma, preservación, transporte, recepción y métodos de análisis de las muestras en el laboratorio

7.1. Protocolo para la toma de muestras en campo

a. Consideraciones previas a la colecta

i. Consideraciones generales

- Se debe contar con los permisos y certificados requeridos para el ingreso a las PTARS y/o ejecución de la colecta de muestras en campo (certificado de vacunación contra la COVID-19, SCTR, etc.).
- Se debe contar con las autorizaciones de acceso a las PTARs y a los colectores (buzones). Esto se debe coordinar con el MVCS y las EPS con anticipación.
- Se debe contar con los materiales, equipos, indumentaria de protección personal y formularios requeridos (ver Tabla 2).
- Se debe contar con movilidad para el transporte del personal a los puntos de monitoreo.

ii. Consideraciones para la toma de muestras en colectores

- Se debe identificar la ubicación del buzón desde donde se tomará la muestra y asegurar su idoneidad con anticipación. Esto debe estar consignado en el Plan de Monitoreo (ver sección IX).
- Se debe coordinar con los representantes de la EPS para realizar el cerco perimétrico y la apertura de los buzones desde donde se realizará la toma de muestra, así como para la interrupción y desvío del tráfico vehicular para el periodo requerido.

iii. Consideraciones para la toma de muestras en PTARs

- Se debe coordinar el ingreso a la PTAR con sus representantes con anticipación.
- Se debe proveer los materiales y equipos necesarios al personal responsable de la toma de muestras en la PTAR (ver Tabla 2).
- Se debe verificar que se realiza el control de la temperatura y que se utilizan envases correctamente sanitizados para la colecta de las muestras.
- Se debe recopilar información de los laboratorios que evalúan parámetros complementarios.

b. Colecta de muestras en campo

En la toma de muestras se debe evitar partículas grandes, sedimentos y/o material flotante que se haya acumulado en el punto de monitoreo. De no ser posible tomar las muestras después del proceso de cribado (en el caso de las PTARs), se debe tomar la muestra evitando recolectar sólidos de gran tamaño.

El personal responsable de la toma de muestra debe colocarse los implementos de protección personal (ver Tabla 2). Los guantes descartables deben ser usados antes del inicio de la actividad y desechados luego de culminado el muestreo en cada punto.

i. Colecta de muestra en colectores

- Verificar el correcto estado de calibración del multiparámetro portátil. Se debe mantener un registro de su calibración y mantenimiento.
- Colectar aprox. 500 mL de muestra simple cada 60 minutos de manera manual (introduciendo un balde amarrado fuertemente con una soga, ver Figura 2).
- Medir y registrar los parámetros de campo: profundidad del colector, profundidad de la lámina de agua, pH, conductividad y temperatura de la muestra, en la ficha de campo (ver Anexo 2). La determinación del pH, conductividad y temperatura se realiza de forma inmediata a la toma de muestra.
- Registrar en la ficha de campo características organolépticas de la muestra colectada tales como sólidos, color, olor, etc., así como eventuales características anómalas de los puntos de monitoreo.
- Documentar la toma de la muestra con fotografías.
- Mantener las muestras simples en una caja térmica a $< 8^{\circ}\text{C}$.
- Una vez terminada la colecta de todas las muestras simples, mezclar todo el volumen en un balde, homogeneizar con la jarra y tomar una muestra compuesta de 1 L para el análisis de SARS-Cov-2, y otra muestra de 250 mL para el análisis de DQO.
- Rotular las botellas conteniendo las muestras para los análisis de laboratorio con la etiqueta previamente preparada y colocarlas dentro de una bolsa de primer uso. Transportar las muestras al laboratorio en una caja térmica con ice-packs a $< 8^{\circ}\text{C}$.
- Descartar el remanente de agua residual en el mismo colector.
- Llenar y firmar la ficha de registro de campo, la cual hace las veces de cadena de custodia.

Figura 2. Procedimiento para la colecta de las muestras de agua residual en los puntos de monitoreo en colector.

<p>Alistar los frascos: Se rotula los frascos para la muestra simple y compuesta, y se guardan en una bolsa de un solo uso.</p>	<p>Acondicionar el cooler: Colocamos los frascos dentro del cooler y juntos con estos los Icepacks a su alrededor, asegurándose armar una cámara interna de Icepacks.</p>	<p>Acondicionar el punto de monitoreo: SEDAPAL se encarga de colocar los conos de seguridad y abrir los buzones.</p>
		
<p>Enjuagar el balde: Se enjuaga el balde con el agua residual colectada del buzón, este enjuague se realiza con un poco de agua residual y se hacen movimientos circulares para asegurar el contacto con toda la superficie interna del balde (tres veces cada vez que se muestrea).</p>	<p>Enjuagar la jarra: Luego de enjuagar el balde se procede a enjuagar la jarra de la misma manera (tres veces cada vez que se muestrea).</p>	<p>Enjuagar los frascos: Luego de enjuagar la jarra se enjuaga cada frasco antes de colectar la muestra de la misma manera (se enjuaga tres veces).</p>
		
<p>Colectar la muestra simple: Luego de enjuagar los frascos se colecta la muestra simple en los dos frascos de 250 mL, se guarda en la bolsa y posteriormente en el cooler.</p>	<p>Toma de parámetros: Junto con el multiparametro se obtiene la temperatura, pH y conductividad. Esta se toma del agua sobrante del paso anterior, y se anota en la pizarra.</p>	<p>Toma de profundidad: Junto con una wincha se mide la profundidad del nivel superficial que alcanza el agua residual.</p>
		
<p>Colectar la cuarta muestra: Para la cuarta muestra (la compuesta), igualmente se enjuaga el balde y la jarra, pero en esta última se colecta los 500mL, ya no en dos frascos de 250mL.</p>	<p>Colectar la muestra compuesta: En la jarra se vierte el contenido de las tres muestras simples anteriormente tomadas (los seis frascos de 250mL)</p>	<p>Enjuagar el frasco de la muestra compuesta: Igualmente se enjuaga el frasco de 1L con la muestra compuesta obtenida de la jarra (tres veces se enjuaga).</p>
		
<p>Envasado del frasco: Se coloca la contratapa en el frasco de 1L, se enrosca la tapa, se coloca en la bolsa, y finalmente es el único frasco que se guarda en el cooler.</p>	<p>Adecuación del cooler: Teniendo el frasco de la muestra compuesta ya envasada, esta se coloca en el cooler asegurando que los Icepacks formen una cámara en contacto con el frasco.</p>	<p>Lavar todos los instrumentos: Finalmente con agua y detergente se lava el balde, la jarra y soga utilizada.</p>

ii. Colecta de muestra en PTARs

- En lo posible, se recomienda usar muestreadores automáticos programados para coleccionar muestras horarias de al menos 500 mL, por un periodo de 24 h. Esta es la situación ideal, para poder contrastar la data de agua residual con los indicadores del sector salud. De no contar con un muestreador automático, se debe coleccionar muestras manualmente, de manera similar a lo descrito para la toma de muestras en colectores. Los periodos de coleccion de la muestra compuesta podrán variar de 4 a 24 h según los recursos disponibles.
- Mantener la temperatura baja, a $< 8^{\circ}\text{C}$, agregando hielo y/o ice packs dentro del reservorio del colector automático. En el caso de realizar muestreo manual, mantener las muestras en refrigeradoras o cajas térmicas con ice packs. Registrar la temperatura en el contenedor donde están las botellas con muestras simples usando un termohigrómetro o un data logger. Hacer reemplazos periódicos del hielo y/o ice packs (p. ej. cada 4 – 6 h) para garantizar la temperatura baja durante todo el proceso de coleccion de muestras (p. ej. 24 h).
- Una vez que se coleccionan todas las muestras simples, mezclarlas en un balde para generar una muestra compuesta, y tomar una alícuota de 1 L.
- Rotular la botella conteniendo la muestra para el laboratorio con la etiqueta previamente preparada y colocarla dentro de una bolsa de primer uso.
- Transportar la muestra al laboratorio en refrigeración ($< 8^{\circ}\text{C}$) en caja térmica con ice-packs.
- El remanente de agua residual se usa para los otros análisis de rigor establecidos en la PTAR.
- Llenar y firmar la ficha de registro de campo (ver Anexo 2), que además hace las veces de cadena de custodia.
- Solicitar al administrador de la PTAR los valores de caudal horario (o el promedio en 24 horas) registrados en el periodo de muestreo. El caudal es clave para poder estimar la carga viral de SARS-CoV-2 en la muestra.
- Solicitar los resultados de los análisis de calidad correspondiente a parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, tales como: Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), en mg/L; Demanda Química de Oxígeno (DQO), en mg/L; y Coliformes termotolerantes, en NMP/mL.

Figura 3. Procedimiento para la colecta de las muestras de agua residual en los puntos de monitoreo en PTAR.

<p>Asegurar el control de temperatura: Agregar icepacks, gelpacks o hielo dentro del muestreador automático para asegurar que las muestras se mantengan en el rango de 2 a 8°C. De ser el caso, los icepacks serán reemplazados cada 4 a 6 horas.</p>	<p>Acondicionar el lugar de monitoreo: Se espera colocar el equipo muestreador automático en un lugar con sombra, o en todo caso, cubrirla con un material que mitigue la radiación solar incidente.</p>	<p>Acondicionar el equipo muestreador automático: La manguera del equipo que colectará la muestra de agua residual debe estar ubicada siempre por debajo del nivel de agua que ingresa a la PTAR.</p>
		
<p>Programar el equipo muestreador automático: Una vez acondicionado el lugar y el equipo muestreador automático, se procede a programarlo para la colecta de muestras simples con una frecuencia horaria por 24 horas.</p>	<p>Preparar la muestra compuesta: Luego de las 24 horas, se procede preparar la muestra compuesta (por mezcla de las 24 muestras simples) en un recipiente de mayor capacidad al volumen total.</p>	<p>Toma de muestras: Finalmente se extrae un litro de la muestra compuesta y se coloca en el frasco preparado para tal fin, asegurándose su correcto sellado (contratapa y tapa).</p>
		

7.2. Cadena de Custodia

Es importante que los envases donde se colectan las muestras estén rotulados correctamente, con el código de la muestra, con letra clara, y sin riesgo de perderse la información del rótulo durante su transporte, recepción y almacenamiento en el laboratorio. Para ello, se recomienda rotular directamente el envase, con un marcador indeleble (el cual puede ser removido en el laboratorio con thinner o etanol) o usar etiquetas con buena adhesión. Adicionalmente, se recomienda incluir una etiqueta de papel grueso con el código de la muestra escrito con lápiz de carbón, en la bolsa de primer uso donde se coloca el envase con la muestra para su transporte y almacenamiento.

Es importante que todas las muestras estén codificadas. El código debe ser unívoco, y debe poder identificar como mínimo el punto de monitoreo, la fecha de la colecta, y el operario que realiza la colecta, así como un número correlativo, de ser el caso. Un ejemplo de codificación de muestras se presenta en el Anexo 1.

Una vez finalizada la colecta de la muestra para el laboratorio, se debe llenar la ficha de campo (ver ejemplo en el Anexo 2). Esta hace las veces de cadena de custodia. En esta ficha se debe indicar el código de la muestra, los parámetros de laboratorio que se deben evaluar, los parámetros medidos en campo, los responsables del muestreo, el rango horario en el que se realizó el muestreo, el tiempo que duró todo el proceso de muestreo, y cualquier otra observación o información relevante. Por ejemplo, se debe registrar la temperatura de la caja térmica al inicio de la toma de la muestra, al final del proceso de muestreo, y a la recepción de la muestra en el laboratorio. Esta ficha debe ser firmada por lo menos por la persona que ejecuta el muestreo y la persona que recibe la muestra en el laboratorio. El laboratorio

mantiene registro de todas las fichas técnicas de las muestras colectadas y analizadas para efectos de trazabilidad.

Al finalizar las actividades de muestreo, los equipos deben mantenerse en óptimo estado de limpieza y en buenas condiciones de funcionamiento. Se debe mantener un registro del mantenimiento de cada instrumento utilizado en los ensayos. En este se debe registrar la fecha de calibración o calificación operacional del equipo, así como cualquier problema observado durante su funcionamiento. Se recomienda que este registro se mantenga en una plataforma digital.

7.3. Controles de calidad del muestreo

Los controles de calidad otorgan garantías de confiabilidad de las actividades desarrolladas en el proceso de muestreo y emisión de los resultados. Estos incluyen, como mínimo, los siguientes:

- **Blanco de viaje:** Sirve para evaluar la posible contaminación de la muestra durante el transporte. Consiste en una botella con agua destilada que se mantiene cerrada y acompaña a las muestras durante el transporte. Se debe evaluar por lo menos una vez para cada punto de monitoreo, al inicio del estudio.
- **Blanco de campo:** Sirve para evaluar posible contaminación con SARS-CoV-2 proveniente del ambiente o los equipos de medición en campo. Consiste en una botella con agua destilada que se deja abierta durante la colecta de la muestra, y que entra en contacto con los equipos de medición antes de ser estos colocados en la muestra. Se debe evaluar por lo menos una vez para cada punto de monitoreo durante el estudio.
- **Blanco de frascos:** Sirve para evaluar posible contaminación por la limpieza de los frascos. Consiste en una botella lavada y tratada que se mantiene con agua destilada para controlar la eficacia del proceso de limpieza de utensilios. Se debe evaluar por lo menos una vez al mes, para asegurar una eficacia continua en el lavado de los utensilios.
- **Blanco de laboratorio:** Sirve para evaluar posible contaminación por aerosoles en el ambiente de laboratorio. Consiste en una muestra de agua ultrapura que es analizada junto con otras muestras de aguas residuales. Se debe evaluar por lo menos una vez al mes, para garantizar que el ambiente de laboratorio se mantiene idóneo para los ensayos.

En todos estos controles o 'blancos' se evalúa la presencia del material genético (ARN) del SARS-CoV-2.

7.4. Protocolo para el análisis de las muestras en el laboratorio

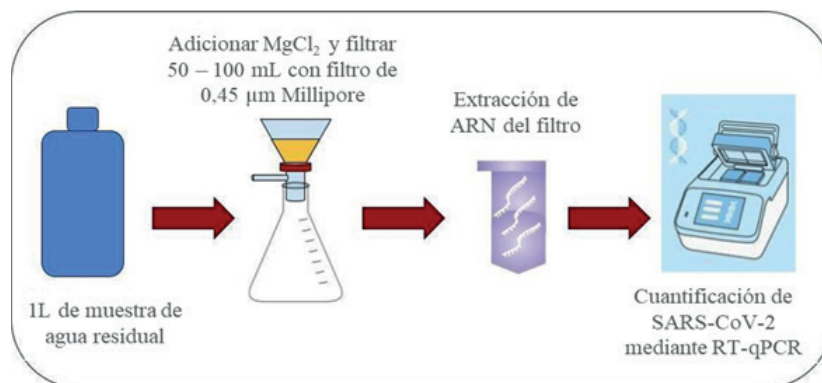
a. Disposiciones generales

El método para cuantificar los genomas de SARS-CoV-2 en muestras de agua residual consiste en 3 pasos:

- (1) captura y concentración de partículas virales;
- (2) purificación del ARN total de la muestra; y
- (3) amplificación mediante RT-qPCR.

Un esquema general del proceso se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Esquema general del proceso de concentración y análisis del SARS-CoV-2 en muestras de agua residual.



Fuente: Elaboración propia

b. Concentración de partículas virales

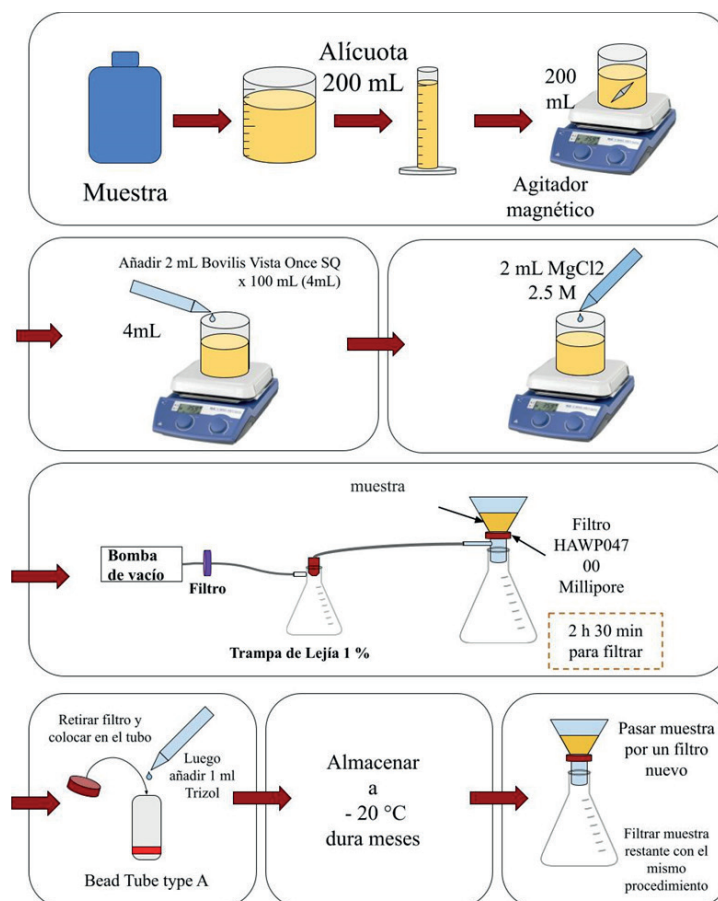
El método propuesto para la concentración de partículas virales es una modificación del método de adsorción-elución en membranas electronegativas de Katayama y col. 2002, y Symonds y col. 2014 (Katayama et al., 2002; Symonds et al., 2014). Las membranas electronegativas se utilizan normalmente para la concentración de virus entéricos en muestras de agua residual y otros efluentes (Symonds et al., 2014; Teixeira et al., 2017) con una eficiencia de recuperación de 31% a 78% para adenovirus y poliovirus humanos (Ahmed et al., 2015). Los virus envueltos, como el SARS-CoV-2, tienen una alta afinidad de adsorción a la membrana electronegativa (Haramoto et al., 2009), así como a la fracción sólida presente en el alcantarillado, en comparación con los virus no envueltos (Ye et al., 2016).

En una publicación reciente, Ahmed, Bertsch y col. 2020 comparó siete métodos diferentes para la concentración de virus y la posterior detección mediante RT-qPCR, basados en la recuperación del virus de la hepatitis murina (MHV), que también es un coronavirus, para

evaluar la detección del SARS-CoV-2 de las aguas residuales (Ahmed, Bertsch, et al., 2020). Los autores informaron que los dos métodos más eficientes fueron el método de adsorción-extracción (sin acidificación) con la adición de $MgCl_2$ (concentración final de 25 mM), con un 65,7% de eficiencia de recuperación del MHV, y el mismo método a pH neutro (sin adición de $MgCl_2$), con un 56,0% de recuperación del virus MHV. Así mismo, reportaron el método de adsorción-extracción (con acidificación) con la adición de $MgCl_2$ (concentración final de 25 mM), que resultó en 50% de recuperación del virus MHV. En nuestro estudio comparamos estos 3 métodos, y obtuvimos resultados similares a los reportados por Ahmed, Bertsch y col. 2020.

En esta Guía presentamos el método de recuperación basado en adsorción-elución en membrana electronegativa, con adición de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), sin acidificar. Este es un método simple, de bajo costo, y relativamente rápido para procesar un gran número de muestras, en comparación con otros métodos como ultrafiltración en dispositivos Centricron o Amicon, o ultracentrifugación, usado ampliamente en los laboratorios de virología, que requiere equipamiento sofisticado. Un esquema general del procedimiento se puede observar en la Figura 5.

Figura 5. Esquema general del proceso de concentración de virus SARS-CoV-2 de las muestras de agua residual basado en adsorción-elución en membranas electro-negativas.



Fuente: Elaboración propia

Antes de comenzar:

- Se debe verificar que se cuenta con todos los materiales y equipamiento requerido, descrito en las secciones anteriores (ver Tabla 3).
- Se debe esterilizar todo el material que entrará en contacto con la muestra. El material de vidrio y de metal se esteriliza con calor seco en un horno a 200 °C durante 2 horas. Esto elimina enzimas que degradan RNA (RNAsas), que no pueden ser destruidas completamente con esterilización por autoclave. El material de plástico, papel, y membranas se esteriliza por autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Luego, se procede de la siguiente manera:

- Se mide y transfiere un volumen de 100 mL a un vaso de precipitados conteniendo una barra magnética.
- Utilizando la jeringa, se agrega 2 mL de la vacuna Bovilis Vista Once SQ (MSD Animal Health) que contiene un número conocido de partículas (TCID50) del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV).
- Se homogeniza la muestra con un agitador magnético y se agrega 1 mL de MgCl₂ (2.5M) a la muestra, para obtener la concentración final de 25 mM.
- Se filtran como mínimo 55 mL de la muestra (considerando el volumen añadido de los reactivos), o el volumen que se logre filtrar en un intervalo de 2 horas a través de la membrana éster de celulosa HAWP04700 previamente autoclavada y ensamblada en el sistema de filtración (sobre el portafiltras) estéril (ver Figura 6).
- Luego de 60 a 90 minutos, se retira la membrana del portafiltras con pinzas previamente esterilizadas.
- Finalmente, se coloca la membrana doblada dentro del tubo con perlas cerámicas (Type A Bead Tube, Macherey-Nagel) conteniendo 1 mL de TRIzol™, para el método de extracción TRIzol® salino, o 770 µL buffer RST1 y 230 µL de NucleoZOL, para el método de extracción NucleoSpin® RNA Stool.
- Con ayuda de tijeras estériles, se corta el filtro dentro del tubo hasta disgregarlo homogéneamente en la solución.
- Se almacenan los tubos a -20 °C hasta la fecha de extracción del ARN viral.

Figura 6. Ensamblaje del sistema para la filtración de muestras de agua residual.



c. Purificación de ácidos nucleicos (ARN)

Para la purificación del ARN viral, se investigaron métodos que permitieran obtener alto rendimiento de ARN, con alta pureza y baja presencia de compuestos inhibidores de la PCR. En nuestro estudio se compararon varios métodos y se seleccionaron el método TRIzol® salino (Invitrogen™), y el kit NucleoSpin® RNA Stool de Macherey-Nagel. El método que nos dio los mejores resultados, con base en la pureza y ausencia de inhibidores, fue el kit NucleoSpin® RNA Stool de Macherey-Nagel. Esto se debe a que en el proceso de extracción se usan 2 columnas de limpieza, una para remover inhibidores, y otra para seleccionar (*bind*) el ácido nucleico. No obstante, el método TRIzol® salino es bastante más económico y, en nuestro estudio, nos dio resultados comparables al método NucleoSpin® RNA Stool. De cualquier manera, es importante que una vez que se opte por un método de purificación de ARN, **este se mantenga constante a lo largo del estudio.**

i. Consideraciones generales

Antes de empezar:

- Se debe verificar que se cuenta con todos los materiales, equipos y reactivos necesarios para el procedimiento (ver Tabla 3).
- Se debe descontaminar la superficie donde se ejecutará el procedimiento: Limpiar la mesa de trabajo con una solución de lejía 1% (v/v), dejar secar, limpiar con etanol 70% (v/v), dejar secar, y luego irradiar la superficie con luz UV-C por 30 min. Si se trabaja en una cabina de bioseguridad, no se limpia la superficie con lejía, sólo con etanol.
- Se debe colocar toda la indumentaria de protección personal (ver Tabla 3).
- Las muestras deben mantenerse en una caja térmica con hielo al inicio de la extracción.
- De preferencia, realizar la purificación de ARN el mismo día en el que se hace la filtración.
- Las membranas en solución de preservación pueden guardarse hasta varios meses a -20oC.

ii. Método del TRIzol™ salino

El protocolo está disponible en: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf. Se procede de la siguiente manera:

- Los tubos con las membranas con muestra se descongelan colocándolos sobre hielo durante 5 - 10 minutos.
- La muestra se somete a lisis con vortex a máxima velocidad en posición horizontal durante 10 minutos.
- Se centrifuga la muestra a 12000 x g, 4 °C durante 10 minutos para eliminar la espuma generada.
- El sobrenadante (700-800 µL) se traspasa a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL.

- Se agregan 200 μ L de cloroformo y se agita vigorosamente en vortex durante 10 segundos.
- Se incuban los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se centrifugan los tubos a 12000 x g, a 4 °C, durante 15 minutos.
- Se colecta el sobrenadante (la fase acuosa translúcida, aprox. 500-550 μ L) en un tubo de microcentrífuga de 2,0 mL estéril en hielo.
- Se agregan 250 μ L de isopropanol y 250 μ L de solución salina de precipitación (citrato de sodio 0.8 M, cloruro de sodio 1.2 M) y se mezcla con vortex durante 5 segundos.
- Se incuban los tubos a temperatura ambiente durante 5 min.
- Luego, se centrifugan los tubos a 12,000 x g por 8 minutos a 4 °C. En el fondo de los tubos se debería observar un pellet blanquecino.
- Se descarta el sobrenadante sin perder de vista el pellet (que está constituido por el ARN total de la muestra).
- Para lavar el pellet, a cada tubo se agrega 1 mL de etanol 75% y se mezcla con vortex a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Se centrifuga a 12000 x g durante 1 min. Se descarta el etanol sobrante sin perder el pellet.
- Se repiten una vez más los dos pasos anteriores (dos lavados en total).
- Para recoger el etanol residual, se centrifuga a 12000 x g durante 1 min.
- Con una micropipeta de 100 μ L, se extraen todos los restos de alcohol residual de la muestra.
- Se deja secar el pellet a temperatura ambiente durante 10 minutos con la tapa de los tubos abierta (de modo que el etanol se evapore).
- Se agregan 100 μ L de agua ultrapura al pellet.
- Se incuba a 55 °C durante 15 min o hasta observar que el pellet se haya disuelto completamente (con los tubos tapados).
- Se mezcla la muestra con vortex durante 5 segundos y se centrifuga a 12000 x g durante 1 min.
- Se recolecta el sobrenadante en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL. Ese constituye el preparado de ARN.
- Se mide la concentración del purificado de ARN en el espectrofotómetro NanoDrop, usando 1 μ L de solución de ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, se puede medir la concentración de ARN usando el Qubit Fluorómetro, con el reactivo Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen, Q10210), y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- La muestra se congela a -80 °C hasta el siguiente paso en el análisis (amplificación por RT-qPCR).

Para más información sobre este protocolo, se recomienda leer el manual con especificaciones técnicas del reactivo TRIzol™ provisto por el fabricante.

iii. Método del NucleoSpin® RNA Stool.

El protocolo se realiza tal como indica el fabricante. Este está disponible en: <https://www.mn-net.com/media/pdf/fa/c8/ac/Instruction-NucleoSpin-RNA-Stool.pdf>. Se usan las modificaciones al protocolo recomendadas por el fabricante para la purificación de material genético del virus SARS-CoV-2, específicamente. Estas recomendaciones están disponibles en: <https://www.mn-net.com/media/pdf/44/7b/8d/SP-Recommendation-viral-nucleic-acid-isolation-from-water.pdf>. Un esquema general del procedimiento se describe en la Figura 7.










Para la extracción de ARN viral de SARS-CoV-2 se procede de la siguiente manera:

- Se agrega 230 μ L NucleoZOL y 770 μ L buffer RST1 a la membrana con la muestra filtrada. Esto se debe hacer inmediatamente después del proceso de filtrado. La membrana se puede guardar varios meses en esta solución de preservación a -20°C .
- Se mezcla vigorosamente con vortex por 10 min, manteniendo el tubo vertical. Se centrifuga 5 min a 13.000 x g, y se transfiere 510 μ L de sobrenadantes a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL limpio.
- Se adiciona 180 μ L de buffer RST2, se homogeneiza en vortex por 5 s, y se centrifuga 3 min a 13.000 x g.
- Se transfiere el sobrenadante a la NucleoSpin® Inhibitor Removal Column (la que tiene un anillo rojo), y se centrifuga por 1 min a 13.000 x g.
- Al volumen filtrado, se añaden 180 μ L de Buffer RST2 y se homogeneiza en vortex por 5 s.
- Se transfiere 600 μ L de muestra en la NucleoSpin® RNA Stool Column (la que tiene un anillo azul), y se centrifuga por 1 min a 13.000 x g. Repetir hasta cargar toda la muestra. Se descarta el volumen filtrado (el ARN está retenido en la columna).
- Se adiciona 600 μ L de Buffer RST3. Centrifugar 30 s a 11.000 x g. Descartar el volumen filtrado. (Se omite el paso de digestión de ADN con la rDNase).
- Se adiciona 600 μ L de Buffer RST4 y se centrifuga 1 min a 13.000 x g.
- Se adiciona 600 μ L de Buffer RST2, y se centrifuga 1 min a 13.000 x g.
- Se adiciona 600 μ L de Buffer RST5, y se centrifuga 1 min a 13.000 x g.
- Se centrifuga 2 min a 11.000 x g para secar la membrana.
- Se coloca la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril, se adiciona 100 μ L de agua libre de nucleasas, se incuba 5 min, y se centrifuga 30 s a 11.000 x g.
- Se mide la concentración del purificado de ARN en el espectrofotómetro NanoDrop, usando 1 μ L de solución de ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, se puede medir la concentración de ARN usando el Qubit Fluorómetro, con el reactivo Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen, Q10210), y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- La muestra se congela a -80°C hasta el siguiente paso en el análisis (amplificación por RT-qPCR).

Para más información sobre este protocolo, se recomienda revisar el manual con instrucciones técnicas del kit de extracción NucleoSpin® RNA Stool, provisto por el fabricante.

Figura 7. Esquema general del proceso de extracción de ARN viral a partir de membranas Millipore usando el kit NucleoSpin® RNA Stool.

RNA from stool samples Protocol at a glance (Rev. 02)

		NucleoSpin® RNA Stool	
1	Prepare sample		<p>NucleoSpin® Bead Tube Type A</p> <p>180–220 mg sample material</p> <p>200 µL NucleoZol</p> <p>660 µL Buffer RST1</p>
2	Sample lysis		<p>Horizontally vortex 10 min at RT or use other homogenizers according to manufacturers protocol</p> <p>13,000 x g, 5 min</p> <p>Transfer 510 µL supernatant</p>
3	Precipitate contaminants		<p>140 µL Buffer RST2</p> <p>Vortex 5 s</p> <p>13,000 x g, 3 min</p>
4	Filter lysate		<p>Load supernatant on NucleoSpin® Inhibitor Removal Column (red ring)</p> <p>13,000 x g, 1 min</p>
5	Adjust binding conditions		<p>180 µL Buffer RST2 or 120 µL Buffer RST2</p> <p>Vortex 5 s</p>
6	Bind RNA		<p>Load 600 µL sample on NucleoSpin® NucleoSpin® RNA Stool Column (light blue ring)</p> <p>13,000 x g, 1 min</p> <p>Load remaining sample</p> <p>13,000 x g, 1 min</p>
7	Wash silica membrane and digest DNA		<p>1st</p> <p>600 µL Buffer RST3</p> <p>11,000 x g, 30 s</p>
			<p>80 µL rDNase reaction mixture</p> <p>RT, 15 min</p>
			<p>2nd</p> <p>600 µL Buffer RST4</p> <p>13,000 x g, 1 min</p>
			<p>3rd</p> <p>600 µL Buffer RST2</p> <p>13,000 x g, 1 min</p>
<td> <p>4th</p> <p>600 µL Buffer RST5</p> <p>13,000 x g, 1 min</p> </td>	<p>4th</p> <p>600 µL Buffer RST5</p> <p>13,000 x g, 1 min</p>		
8	Dry silica membrane		<p>11,000 x g, 2 min</p>
9	Elute RNA		<p>100 µL RNase free H₂O</p> <p>11,000 x g, 30 s</p>

Fuente: RNA from stool samples. User manual. NucleoSpin® RNA Stool, 2017

d. Amplificación por RT-qPCR

En esta guía presentamos los procedimientos recomendados por los CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2020), para determinar la presencia de SARS-CoV-2 con la técnica de RT-qPCR, adaptado para muestras de aguas residuales. **De no tener experiencia previa analizando muestras de ARN por RT-PCR, se recomienda participar en un periodo de capacitación previo, en un laboratorio competente, antes de implementar los procedimientos descritos a continuación en su laboratorio.**

i. Consideraciones generales

- Antes de comenzar, se debe verificar que se cuente con todos los materiales, equipos y reactivos necesarios (ver Tabla 4).
- En este protocolo se utiliza el ensayo TaqMan y el kit de cebador y sonda marcada con FAM/BHQ1 (Black Hole Quencher® -1). No obstante, cada laboratorio puede validar sus propios reactivos según sus protocolos internos.
- Se deben colocar la indumentaria de protección personal, como guantes, batas de laboratorio y protección para los ojos (ver Tabla 3).
- Es importante utilizar siempre guantes sin talco para preparar reacciones de PCR.
- Se debe manipular los reactivos de biología molecular en el lugar apropiado y con guantes limpios.
- Se debe utilizar siempre puntas de micropipeta con barreras (filtros).
- Se deben limpiar las mesas de trabajo, pipetas y equipos requeridos antes y después de cada uso con una solución de alcohol al 70% v/v. Las mesas de trabajo se deben limpiar además con una solución de lejía 10% (v/v).
- Antes de cada experimento, se debe descontaminar la superficie de las mesas de trabajo, cajas de puntas de micropipetas, guantes de trabajo, y micropipetas con la solución RNase Away™.
- Todo el material de plástico reutilizable se descontamina sumergiéndose en una solución de lejía al 1% v/v por 1 h, y luego enjuagado con abundante agua tipo III.
- Los cebadores, las sondas (incluidas las alícuotas) y la mezcla con las enzimas deben descongelarse y conservarse sobre hielo o en un bloque refrigerado durante todo el tiempo de preparación y uso.
- Las muestras de ARN deben mantenerse sobre hielo o en un bloque refrigerado durante la preparación y uso, para asegurar su estabilidad.

ii. Dilución de los controles

Los controles positivos usados en las reacciones incluyen:

- Plásmido 2019-nCoV_N_Positive Control,
- Plásmido Hs_RPP30 Positive Control,

Estos vienen suspendidos en un tubo que contiene 250 µL (200.000 copias / µL) en buffer TE (pH 8.0). Para su uso, los controles deben diluirse a concentraciones más bajas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos control se pueden diluir en tampón TE, pH 8,0 (Tris 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH 8,0) hasta la dilución óptima determinada internamente para cada laboratorio. En nuestro laboratorio, los plásmidos de ambos controles se diluyen a 10.000 copias/ μ L (alícuota stock) y se almacenan en alícuotas de 20 μ L a -20 °C. En cada experimento, se utiliza una de estas alícuotas para realizar las diluciones; el remanente es descartado al final de cada ensayo de RT-qPCR.

Los controles de recuperación (G-Block BRSV_Ngene) e inhibición (G-Block SKeta22) vienen liofilizados. Estos deben ser resuspendidos con agua ultrapura hasta una concentración de 2×10^{14} copias/ μ L. La cantidad de agua que se debe agregar para la resuspensión se puede calcular según:

$$\text{Volumen de agua de resuspensión (}\mu\text{L)} = \text{Nanomoles por tubo} \times 6.022$$

Haciendo diluciones seriadas de 1 en 10, estos controles se diluyen hasta obtener alícuotas de 20 μ L con una concentración de 20.000 (2×10^4) copias/ μ L. Esta solución la llamamos 'alícuota de trabajo' y se almacena de manera similar a los controles positivos para SARS-CoV-2 y el gen RPP30, mencionados anteriormente.

Para la manipulación de controles se deben tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Los controles deben almacenarse entre -15 °C y -30 °C, a temperatura constante.
- El control positivo para SARS-CoV-2 concentrado, con 200.000 copias/ μ L, debe manejarse con extremo cuidado, lejos de los sitios de extracción y preparación de las muestras, y también lejos del termociclador y la zona de preparación de reacciones de RT-qPCR, para minimizar el riesgo de contaminación.
- Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación-descongelación. Lo ideal es dividir el control original en alícuotas más pequeñas, como se indica anteriormente.
- Las sondas presentes en el kit 2019-nCoV RUO son sensibles a la luz, no se deben manipular bajo luz directa.

iii. Preparación de las curvas estándar

Las curvas estándar consisten en diluciones en serie del control positivo. Se realizan sólo para los análisis cuantitativos. Para el análisis de SARS-CoV-2 preparamos curvas estándar con:

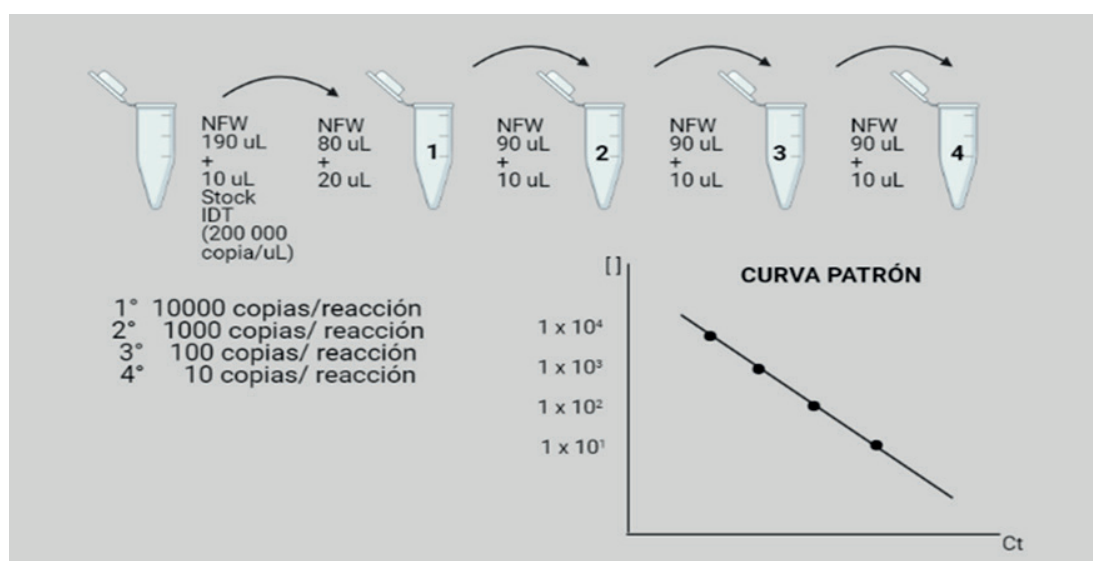
- El control positivo 2019-nCoV_N para ambas secuencias diana o *targets* N1 y N2.
- El G-Block BRSV_Ngene para el control de recuperación, gen N del BRSV.

Para el análisis de los targets N1 y N2 del genoma del SARS-CoV-2 (control 2019-nCoV_N), el primer punto de la curva estándar se evalúa con una concentración de 1×10^4 copias por reacción (ver Figura 8). Para preparar este control se procede de la siguiente manera:

- Se diluye los 20 μ L del alícuota stock (con 10.000 copias/ μ L) adicionando 80 μ L de agua libre de nucleasas para obtener una solución de trabajo a 2×10^3 copias / μ L, el cual se utiliza como primer punto de la curva estándar. Considerando que se adiciona 5 μ L a la reacción de PCR, se tiene que este punto en la curva estándar corresponde a 1×10^4 copias / reacción (Figura 8).

- Se preparan 3 diluciones adicionales con un factor 1/10 para generar los 4 puntos de la curva estándar, conforme se muestra en la Figura 8.

Figura 8. Dilución en serie del control 2019-nCoV_N para preparar la curva estándar para la cuantificación del genoma de SARS-CoV-2.



Además de los 4 puntos de la curva estándar, se prepara un quinto control positivo que denominamos control de cuantificación. Este se obtiene diluyendo el control 2019-nCoV_N para obtener una concentración entre 10 y 10.000 copias por reacción. Este control de cuantificación se analiza como si fuera una muestra más, y se utiliza para optimizar el análisis cuantitativo (p. ej. ajustar la línea de 'threshold' o umbral de la corrida de PCR).

El control de inhibición (G-Block_Sketa22) y el control humano (RPP30 o 'RP'), o el control PMMoV, que se usan como control endógeno en las reacciones, no requieren curvas estándar. Con respecto al control RP, se sugiere también preparar una dilución de trabajo de 4×10^3 copias/µL, la cual debe ser diluida a 200 copias/µL. De esta manera, se obtiene una concentración de 10^3 copias por reacción de RT-qPCR, como es recomendado por el fabricante (https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/supplementary-product-info/supplemental-information---2019-ncov-plasmid-controls.pdf?sfvrsn=f1f1407_4). Estas diluciones pueden variar según cada laboratorio, equipo y mezcla de reacción utilizados.

En el caso del control Sketa22 (ADN de salmón), se requiere preparar una dilución de 10^4 copias/µL a partir del alícuota stock, a fin de añadir 10^4 copias del gen por reacción de RT-qPCR, tal como ha sido descrito previamente (Ahmed, Bivins, et al., 2020).

Además, se deben tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- El volumen mínimo a pipetear debe ser de 2 μ l, para evitar errores de pipeteo.
- Es deseable que la curva estándar tenga al menos 5 puntos.
- La curva estándar se puede diluir con agua ultrapura (libre de nucleasas, NFW) o en algún tipo de vehículo como diluyente (por ejemplo, tRNA de levadura 100 ng / μ L).
- Con cada pipeteo, los microtubos se deben homogeneizar brevemente en el vortex seguidos por un spin-down.
- Se sugiere preparar la curva estándar poco tiempo antes de preparar las reacciones de PCR.
- Las reacciones control y muestra problema deben realizarse por triplicado, para cada punto de la curva estándar.

iv. Procedimientos de amplificación

Para las reacciones de PCR en tiempo real, se utiliza el kit MasterMix Itaq Universal Probes One Step (Biorad). Esta mezcla presenta una combinación de iScript RNase H + transcriptasa inversa y ADN polimerasa hot start iTaq para completar reacciones en tiempo real en un solo paso. Los reactivos utilizados en la reacción de PCR y sus respectivas concentraciones se detallan en la Tabla 5. Se toma en consideración las concentraciones sugeridas por el fabricante. Cada laboratorio debe establecer un protocolo según el kit elegido. El volumen final de cada reacción es 20 μ L. Las reacciones se realizan por triplicado, tanto para las muestras como para los controles negativos y positivos.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de RT-qPCR para los targets SARS-CoV-2 N1 y N2, y RP Humana. N, número de reacciones de PCR que se desea realizar x 1.1 (se considera un 10% adicional de reacciones para compensar por la pérdida de volumen durante el pipeteo). Por ejemplo, si deseo realizar 10 reacciones, el valor de N para preparar la mezcla de reacción debe ser 11.

Nro.	Reactivos	Volumen (μ l) por reacción	Volumen (μ l) para las mezclas de reacción
1	Agua libre de Nucleasas	3	N x 3
2	Primer/Probe Mix	1,5	N x 1,5
3	Reverse Transcriptase	0,5	N x 0,5
4	Master Mix One-Step Kit (2X)	10	N x 10
5	Muestra/Controles	5	-
Volumen Final		20,0	

En la cabina para preparación de las reacciones de PCR previamente limpiada e irradiada con luz UV-C, se coloca una placa de 96 pocillos en la que se dispensa 15 μ L de la mezcla de reacción (conteniendo los reactivos 1 – 4 de la Tabla 5) en cada pocillo. Luego, se agrega 5 μ L de agua libre de nucleasas en cada reacción correspondiente al control sin ARN plantilla (NTC). Luego, se adicionan 5 μ L de las muestras y, al final, se agrega 5 μ L de los controles positivos a las reacciones correspondientes. Se recomienda analizar la muestra problema sin dilución y con una dilución 1/10, y/o con alguna dilución entre estas (p. ej. 1/5 o 1/2).

Finalmente, cada laboratorio debe estandarizar la distribución de muestras y controles en la placa de PCR. En la Figura 9 se muestra un ejemplo de distribución utilizado en nuestro laboratorio.

Figura 9. Placa de PCR mostrando la distribución de muestras y controles para la determinación del SARS-CoV-2. SARS_CoV_PC, control positivo para SARS-CoV-2 analizado en varias diluciones para el target 'N1' y 'N2'. Ctrl Cuant, control de cuantificación. NTC, control sin ARN plantilla. RP_PC, control positivo para el gen humano RPP30 utilizado como control endógeno en el ensayo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SARS_CoV_PC S N1 1E4	SARS_CoV_PC S N1 1E4	SARS_CoV_PC S N1 1E4	SARS_CoV_PC S N1 1E3	SARS_CoV_PC S N1 1E3	SARS_CoV_PC S N1 1E3	SARS_CoV_PC S N1 100	SARS_CoV_PC S N1 100	SARS_CoV_PC S N1 100	SARS_CoV_PC S N1 10	SARS_CoV_PC S N1 10	SARS_CoV_PC S N1 10
B	0.1X Muestra 1 U N1	0.1X Muestra 1 U N1	0.1X Muestra 1 U N1	0.1X Muestra 2 U N1	0.1X Muestra 2 U N1	0.1X Muestra 2 U N1	0.1X Muestra 3 U N1	0.1X Muestra 3 U N1	0.1X Muestra 3 U N1	0.1X Muestra 4 U N1	0.1X Muestra 4 U N1	0.1X Muestra 4 U N1
C	0.1X Muestra 5 U N1	0.1X Muestra 5 U N1	0.1X Muestra 5 U N1	0.1X Muestra 6 U N1	0.1X Muestra 6 U N1	0.1X Muestra 6 U N1	Ctrl Cuant. 150 cop. U N1	Ctrl Cuant. 150 cop. U N1	Ctrl Cuant. 150 cop. U N1	NTC N N1	NTC N N1	NTC N N1
D	SARS_CoV_PC S N2 1E4	SARS_CoV_PC S N2 1E4	SARS_CoV_PC S N2 1E4	SARS_CoV_PC S N2 1E3	SARS_CoV_PC S N2 1E3	SARS_CoV_PC S N2 1E3	SARS_CoV_PC S N2 100	SARS_CoV_PC S N2 100	SARS_CoV_PC S N2 100	SARS_CoV_PC S N2 10	SARS_CoV_PC S N2 10	SARS_CoV_PC S N2 10
E	0.1X Muestra 1 U N2	0.1X Muestra 1 U N2	0.1X Muestra 1 U N2	0.1X Muestra 2 U N2	0.1X Muestra 2 U N2	0.1X Muestra 2 U N2	0.1X Muestra 3 U N2	0.1X Muestra 3 U N2	0.1X Muestra 3 U N2	0.1X Muestra 4 U N2	0.1X Muestra 4 U N2	0.1X Muestra 4 U N2
F	0.1X Muestra 5 U N2	0.1X Muestra 5 U N2	0.1X Muestra 5 U N2	0.1X Muestra 6 U N2	0.1X Muestra 6 U N2	0.1X Muestra 6 U N2	Ctrl Cuant. 150 cop. U N2	Ctrl Cuant. 150 cop. U N2	Ctrl Cuant. 150 cop. U N2	NTC N N2	NTC N N2	NTC N N2
G	RP_PC S RP 1E3	RP_PC S RP 1E3	RP_PC S RP 1E3	0.1X Muestra 5 U RP	0.1X Muestra 5 U RP	0.1X Muestra 5 U RP	0.1X Muestra 6 U RP	0.1X Muestra 6 U RP	0.1X Muestra 6 U RP	NTC N RP	NTC N RP	NTC N RP
H	0.1X Muestra 1 U RP	0.1X Muestra 1 U RP	0.1X Muestra 1 U RP	0.1X Muestra 2 U RP	0.1X Muestra 2 U RP	0.1X Muestra 2 U RP	0.1X Muestra 3 U RP	0.1X Muestra 3 U RP	0.1X Muestra 3 U RP	0.1X Muestra 4 U RP	0.1X Muestra 4 U RP	0.1X Muestra 4 U RP

La placa que se muestra en la Figura 9 es un ejemplo de distribución para pruebas cuantitativas. Para pruebas cualitativas (presencia/ausencia), se aplica sólo el control positivo 2019-nCoV_N diluido a 200 copias/ μ L (1000 copias/reacción). No se requiere incluir una curva estándar.

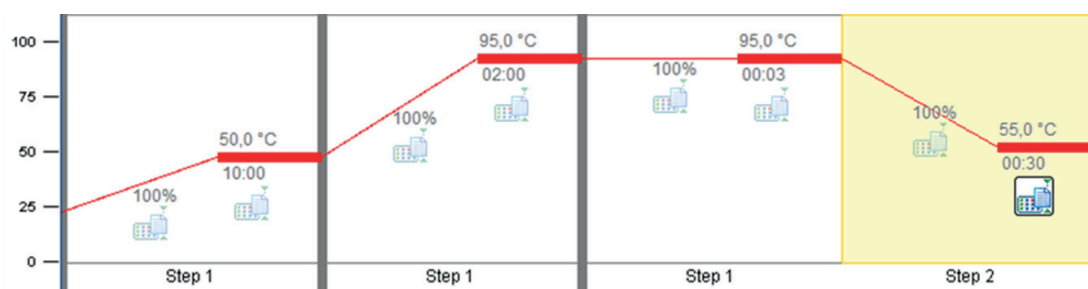
Después de ensamblar la microplaca, se sella con el film óptico (MicroAmp Optical Adhesive Film PCR) y se centrifuga brevemente (30 segundos a 500 x g) para eliminar las burbujas. La Tabla 6 muestra el protocolo de ciclaje utilizado en nuestro laboratorio, sugerido por los fabricantes de la mezcla de reacción, y los cebadores y sondas utilizados. Las temperaturas y los pasos pueden variar según la mezcla utilizada, sólo no se debe variar la temperatura de alineamiento (*annealing*) de los cebadores (55 oC), que es lo que determina la especificidad de la prueba.

Tabla 6. Protocolo de amplificación para la detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR utilizando las regiones objetivo N1, N2 y RP.

Paso	Temperatura	Tiempo
Incubación para la transcripción reversa (RT)	50°C	10 min
Activación de la enzima	95°C	2 min
Amplificación (x 45 ciclos)	95°C	3s
	55°C	30s

Después de programar los pasos para el ciclo de amplificación en el termociclador, se debe indicar al equipo que colecte los datos de fluorescencia (p. ej. con el filtro para el fluoróforo 'FAM') en el paso de amplificación a 55 °C, como se muestra en la Figura 10.

Figura 10. Perfil de ciclaje para la reacción de RT-qPCR.



Todas las secuencias diana analizadas para la determinación de SARS-CoV-2 (N1, N2 y RP) en este protocolo tienen el mismo programa de amplificación y la misma temperatura de hibridación, por lo que pueden colocarse en una misma placa de PCR. Sin embargo, las mezclas de reacción deben prepararse por separado.

Todas las placas deben contener un control negativo (NTC, sin ARN plantilla) para cada set de cebadores, para verificar la ausencia de contaminación en el medio ambiente y/o durante la manipulación.

v. Control de recuperación

El control de recuperación permite determinar la eficacia de recuperación del proceso de filtración. Este control consiste en el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), un virus con envoltura muy similar al SARS-COV-2 presente en una vacuna comercial distribuida por la empresa MSD Animal Health SAC. El control de recuperación consiste en inocular, con una concentración inicial conocida del BRSV una alícuota de ~ 100 mL de las muestras de agua residual. Las muestras (junto al BRSV) se someten a todo el proceso de análisis hasta la cuantificación por RT-qPCR, donde se obtiene la concentración final de partículas virales BRSV. La relación entre la concentración final e inicial del BRSV en las muestras se expresa como tasa de recuperación (Boxus et al., 2005).

Los cebadores y sondas RB94-977, RB94-1076 y RB94-probe (ver Tabla 4 y Anexo 3) son utilizados para la detección del virus BRSV en las muestras. Como indicado en el procedimiento de concentración de las muestras de agua residual, este virus es añadido al agua residual previo a su procesamiento (filtración). El número de copias del virus recuperado, presente en las muestras analizadas, se compara con el número de copias del virus obtenido directamente de 1 mL de vacuna, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de recuperación del virus} = \frac{\text{Nro de copias promedio en la muestra}}{\text{Nro de copias promedio en el control interno}} \times \frac{\text{Volumen filtrado}}{50}$$

A diferencia del ensayo de detección del SARS-CoV-2, este control se realiza en una placa diferente, pues requiere una temperatura de alineamiento (*annealing*) distinta, utilizando distintas concentraciones de cebadores y sondas (Boxus et al., 2005) según se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de RT-qPCR para el control de recuperación. N, número de reacciones de PCR que se desea realizar x 1.1 (se considera un 10% adicional de reacciones para compensar por la pérdida de volumen durante el pipeteo). Por ejemplo, si se desea realizar 10 reacciones, el valor de N sería 11.

Nro.	Reactivos	Volumen (µl) por reacción	Volumen (µl) para las mezclas de reacción
1	Agua libre de Nucleasas	1,85	N x 1,85
2	RB94-977	0,1	N x 0,1
3	RB94-1076	0,1	N x 0,1
4	RB94-probe	0,2	N x 0,2
5	Reverse Transcriptase	0,25	N x 0,25
6	Master Mix One-Step Kit (2X)	5	N x 5
7	Muestra/Controles	2,5	-
Volumen Final		10,0	

Finalmente, un ejemplo de distribución de muestras y controles en la placa de PCR para el análisis del control de recuperación usado en nuestro laboratorio se describe en la Figura 11.

Figura 11. Placa de PCR mostrando la distribución de muestras y controles para la determinación del control de recuperación. BRSV_PC, Control positivo del virus sincitial respiratorio bovino. Ctrl Cuant, control de cuantificación. NTC, control sin ARN plantilla.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A
B	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	BRSV_PC S BRSV_A	Ctrl Cuant. (2 mL d... U BRSV_A	Ctrl Cuant. (2 mL d... U BRSV_A	Ctrl Cuant. (2 mL d... U BRSV_A				NTC N BRSV_A	NTC N BRSV_A	NTC N BRSV_A
C	0.1X Muestra 1 U BRSV_A	0.1X Muestra 1 U BRSV_A	0.1X Muestra 1 U BRSV_A	0.1X Muestra 2 U BRSV_A	0.1X Muestra 2 U BRSV_A	0.1X Muestra 2 U BRSV_A	0.1X Muestra 3 U BRSV_A	0.1X Muestra 3 U BRSV_A	0.1X Muestra 3 U BRSV_A	0.1X Muestra 4 U BRSV_A	0.1X Muestra 4 U BRSV_A	0.1X Muestra 4 U BRSV_A
D	0.1X Muestra 5 U BRSV_A	0.1X Muestra 5 U BRSV_A	0.1X Muestra 5 U BRSV_A	0.1X Muestra 6 U BRSV_A	0.1X Muestra 6 U BRSV_A	0.1X Muestra 6 U BRSV_A	0.1X Muestra 7 U BRSV_A	0.1X Muestra 7 U BRSV_A	0.1X Muestra 7 U BRSV_A	0.1X Muestra 8 U BRSV_A	0.1X Muestra 8 U BRSV_A	0.1X Muestra 8 U BRSV_A
E	0.1X Muestra 9 U BRSV_A	0.1X Muestra 9 U BRSV_A	0.1X Muestra 9 U BRSV_A	0.1X Muestra 10 U BRSV_A	0.1X Muestra 10 U BRSV_A	0.1X Muestra 10 U BRSV_A	0.1X Muestra 11 U BRSV_A	0.1X Muestra 11 U BRSV_A	0.1X Muestra 11 U BRSV_A	0.1X Muestra 12 U BRSV_A	0.1X Muestra 12 U BRSV_A	0.1X Muestra 12 U BRSV_A
F	0.1X Muestra 13 U BRSV_A	0.1X Muestra 13 U BRSV_A	0.1X Muestra 13 U BRSV_A	0.1X Muestra 14 U BRSV_A	0.1X Muestra 14 U BRSV_A	0.1X Muestra 14 U BRSV_A	0.1X Muestra 15 U BRSV_A	0.1X Muestra 15 U BRSV_A	0.1X Muestra 15 U BRSV_A	0.1X Muestra 16 U BRSV_A	0.1X Muestra 16 U BRSV_A	0.1X Muestra 16 U BRSV_A
G	0.1X Muestra 17 U BRSV_A	0.1X Muestra 17 U BRSV_A	0.1X Muestra 17 U BRSV_A	0.1X Muestra 18 U BRSV_A	0.1X Muestra 18 U BRSV_A	0.1X Muestra 18 U BRSV_A	0.1X Muestra 19 U BRSV_A	0.1X Muestra 19 U BRSV_A	0.1X Muestra 19 U BRSV_A	0.1X Muestra 20 U BRSV_A	0.1X Muestra 20 U BRSV_A	0.1X Muestra 20 U BRSV_A
H												

Los parámetros de amplificación (adaptados de Boxus et al, 2005) para el ensayo de control de recuperación se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Protocolo de amplificación por RT-qPCR para el control de recuperación, virus respiratorio sincitial bovino (BRSV).

Paso	Temperatura	Tiempo
Incubación para la transcripción reversa (RT)	50°C	10 min
Activación de la enzima	95°C	2 min
Amplificación (x 45 ciclos)	95°C	15s
	59°C	60s

vi. Control de inhibición

Los componentes presentes en aguas residuales pueden poseer elementos inhibitorios de la reacción de PCR. Para evaluar la presencia de inhibidores, se emplea un control de inhibición. Este consiste en añadir una concentración conocida de ADN exógeno, p. ej. ADN de salmón (G-Block_Sketa22; ver Tabla 4), a 2 muestras:

- (1) una conteniendo diferentes diluciones del preparado de ARN, y
- (2) otra conteniendo agua ultra pura (se entiende que en el agua ultra pura no hay inhibidores de la PCR).

Se someten ambas muestras a amplificación por PCR de tiempo real, con cebadores específicos para el ADN exógeno, p. ej. de salmón (ver Tabla 4). Se compara el C_q de ambas reacciones. En ausencia de inhibidores, ambas reacciones tendrían una diferencia en el valor del C_q menor a 2. De haber inhibidores, ambas reacciones tendrían una diferencia en el C_q mayor a 2, siendo el C_q de la reacción con la muestra (preparado de ARN) mayor que la que contiene ADN de salmón en agua ultrapura.

Para realizar esta prueba, todas las muestras (preparados de ARN) se inoculan con una cantidad conocida del gen ITS de *O. keta* (10.000 copias/reacción) y se comparan con una muestra blanco, consistente en agua libre de nucleasas, a la cual también se adicionan 10.000 copias/reacción. La mezcla de reacción sugerida para el análisis de inhibidores por PCR en tiempo real se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción PCR en tiempo real para evaluar la presencia de inhibidores en los preparados de ARN (control de inhibición). N, número de reacciones de PCR que se desea realizar x 1.1 (se considera un 10% adicional de reacciones para compensar por la pérdida de volumen durante el pipeteo).

Nro.	Reactivos	Volumen (µl) por reacción	Volumen (µl) para las mezclas de reacción
1	Agua libre de Nucleasas	0,25	N x 0,25
2	SketaF2	0,3	N x 0,3
3	SketaR2	0,3	N x 0,3
4	SketaP2	0,4	N x 0,4
5	Reverse Transcriptase	0,25	N x 0,25
6	Master Mix One-Step Kit (2X) ⁸	5	N x 5
7	G-Block <i>O. keta</i>	1	N x 1
8	Muestra	2,5	-
Volumen Final		10,0	

El diseño sugerido para la distribución de muestras y controles en la placa de PCR, para el análisis de inhibición se muestra en la Figura 12.

⁸ Si bien el control de inhibición consiste en ADN no ARN, se usa este master mix para evaluar comportamiento de la reacción en la misma mezcla de reacción usada en los ensayos de RT-qPCR.

Figura 12. Placa de PCR mostrando la distribución de muestras y controles para el análisis de presencia de inhibidores en los preparados de ARN. NTC, control sin ADN plantilla. Sketa22, Secuencia de ADN de Salmón (*Oncorhynchus keta*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	NTC+Sketa Sketa22 TE4	NTC+Sketa Sketa22 TE4	NTC+Sketa Sketa22 TE4	NTC Sketa22	NTC Sketa22	NTC Sketa22						
C	0.1X Muestra 1 Sketa22	0.1X Muestra 1 Sketa22	0.1X Muestra 1 Sketa22	0.1X Muestra 2 Sketa22	0.1X Muestra 2 Sketa22	0.1X Muestra 2 Sketa22	0.1X Muestra 3 Sketa22	0.1X Muestra 3 Sketa22	0.1X Muestra 3 Sketa22	0.1X Muestra 4 Sketa22	0.1X Muestra 4 Sketa22	0.1X Muestra 4 Sketa22
D	0.1X Muestra 5 Sketa22	0.1X Muestra 5 Sketa22	0.1X Muestra 5 Sketa22	0.1X Muestra 6 Sketa22	0.1X Muestra 6 Sketa22	0.1X Muestra 6 Sketa22	0.1X Muestra 7 Sketa22	0.1X Muestra 7 Sketa22	0.1X Muestra 7 Sketa22	0.1X Muestra 8 Sketa22	0.1X Muestra 8 Sketa22	0.1X Muestra 8 Sketa22
E	0.1X Muestra 9 Sketa22	0.1X Muestra 9 Sketa22	0.1X Muestra 9 Sketa22	0.1X Muestra 10 Sketa22	0.1X Muestra 10 Sketa22	0.1X Muestra 10 Sketa22	0.1X Muestra 11 Sketa22	0.1X Muestra 11 Sketa22	0.1X Muestra 11 Sketa22	0.1X Muestra 12 Sketa22	0.1X Muestra 12 Sketa22	0.1X Muestra 12 Sketa22
F	0.1X Muestra 13 Sketa22	0.1X Muestra 13 Sketa22	0.1X Muestra 13 Sketa22	0.1X Muestra 14 Sketa22	0.1X Muestra 14 Sketa22	0.1X Muestra 14 Sketa22	0.1X Muestra 15 Sketa22	0.1X Muestra 15 Sketa22	0.1X Muestra 15 Sketa22	0.1X Muestra 16 Sketa22	0.1X Muestra 16 Sketa22	0.1X Muestra 16 Sketa22
G	0.1X Muestra 17 Sketa22	0.1X Muestra 17 Sketa22	0.1X Muestra 17 Sketa22	0.1X Muestra 18 Sketa22	0.1X Muestra 18 Sketa22	0.1X Muestra 18 Sketa22	0.1X Muestra 19 Sketa22	0.1X Muestra 19 Sketa22	0.1X Muestra 19 Sketa22	0.1X Muestra 20 Sketa22	0.1X Muestra 20 Sketa22	0.1X Muestra 20 Sketa22
H												

Los parámetros de amplificación (adaptados de (Haugland et al., 2005)) para el ensayo de control de inhibidores se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Protocolo de amplificación por PCR en tiempo real para evaluar presencia de inhibidores en los preparados de ARN.

Paso	Temperatura	Tiempo
Incubación para la transcripción reversa (RT) ⁹	50°C	10 min
Activación de la enzima	95°C	2 min
Amplificación (x 45 ciclos)	95°C	15s
	60°C	60s

vii. Interpretación de los resultados de los controles

Control sin plantilla (*no template control, NTC*)

El NTC consiste en utilizar agua libre de nucleasas en reacciones RT-qPCR en lugar de preparados de ARN. **Las reacciones NTC para todos los conjuntos de cebadores y sondas no deben presentar curvas de crecimiento de fluorescencia que crucen la línea de umbral.** Si alguna de las reacciones NTC muestra una curva de crecimiento que cruza el umbral, es posible que se haya producido contaminación. En este caso, se debe invalidar la corrida de PCR y repetir la prueba, siguiendo estrictamente las precauciones mencionadas en el protocolo.

⁹ Si bien se usa ADN, no ARN, para la prueba de inhibición, se mantiene la mezcla de reacción y condiciones de ciclaje similares a la reacción de RT-qPCR.

Control endógeno (Hs_RPP30 Positive Control o "RP")

La RNasa P consiste en material de células humanas no infecciosas cultivadas (tratadas con beta-propiolactona). Se espera que este ARN, de origen humano, esté siempre presente en las muestras de agua residual. De este modo, la detección de este control en las reacciones de RT-qPCR se utiliza para demostrar la recuperación exitosa de ARN en la muestra, así como la integridad del reactivo de extracción. El ácido nucleico purificado debe producir un resultado positivo con el cebador / sondas Hs_RPP30. Debe realizarse este control con todas las muestras. Si no amplifica (resultado negativo), se recomienda investigar la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras de aguas residuales, por ejemplo, repitiendo el análisis diluyendo la muestra (dilución de inhibidores), o repitiendo la purificación del ARN.

Otro control que puede ser usado como control endógeno es el gen CP del virus del mosaico leve de la pimienta (Pepper Mild Mottle Virus, PMMoV). Este virus es mucho más abundante en aguas residuales que el RP, y también está asociado a muestras humanas. Este control endógeno viene siendo usado preferentemente en el análisis de aguas residuales (Gerrity et al., 2021; Jafferli et al., 2021).

Control de recuperación (virus respiratorio sincitial bovino, BRSV)

Con este control se puede estimar la tasa de recuperación de ARN viral en las muestras de aguas residuales, en todo el proceso de análisis (filtración, extracción, y RT-qPCR). Según Ahmed, Bertsch y col. 2020, el porcentaje de recuperación debería ser al menos de 50%. Si este valor se encuentra por debajo, se deben analizar los puntos críticos del proceso y reforzarlos (p. ej. mantener la cadena de frío, procesar muestras lo más frescas posibles, disminuir al mínimo la presencia de ARNasas (enzimas que degradan el ARN), probar métodos alternativos de concentración viral, probar métodos alternativos de purificación de ARN).

Control de inhibición

La prueba de inhibición busca determinar cualitativamente si existen compuestos que inhiban la reacción de RT-qPCR en los preparados de ARN derivados de las muestras de agua residual. Demostrar ausencia de inhibidores es importante para garantizar la precisión y veracidad de la prueba cuantitativa. Esto se determina analizando la diferencia de Cq entre una dilución del preparado de ARN mezclada con 104 copias de un segmento del gen ITS de *O. keta* versus una muestra de agua ultrapura mezclada con la misma cantidad de copias del gen ITS de *O. keta*.

De encontrarse inhibición en las muestras, evidenciado por un $\Delta Ct > 2$, es preciso evaluar si el método de extracción de ARN puede ser mejorado. Esto se puede lograr incluyendo pasos adicionales de limpieza, usando métodos alternativos de purificación, o usando ARN más diluido en la reacción de RT-qPCR. Alternativamente, se puede evaluar añadir promotores o *enhancers* de la PCR (p. ej. BSA) para mejorar el rendimiento de la reacción. Resultados que indiquen presencia de inhibición en las muestras pueden conducir a falsos negativos o determinaciones inexactas de concentración viral, respectivamente.

viii. Análisis de los resultados cualitativos

En la Tabla 11 se presenta la forma de interpretar los resultados cualitativos de la RT-qPCR.

Tabla 11. Matriz de interpretación de los resultados de la prueba de RT-qPCR. RP, gen de la RNase P humana, control endógeno de reacción. NTC, blanco sin ARN plantilla. Cq, ciclo de reacción en el que la fluorescencia generada cruza el umbral

2019nCoV N1	2019nCoV N2	RP	NTC	Resultado	Interpretación
+	+	+	-	Cq < 40 SARS-CoV-2 Detectado	Positivo
-	-	+	-	Cq > 40	Negativo
+	-	+	-	Cq < 40 SARS-CoV-2 Detectado	Positivo para el target N1
-	+	+	-	SARS-Cov-2 Detectado	Positivo para el objetivo N2
-	-	-	-	Inválido, porque no amplifica el RP	Inválido

Nota:

Resultados falsos negativos pueden ocurrir debido a:

- (1) la baja cantidad de virus presente en la muestra, o
 - (2) problemas en la recolección, transporte o manipulación de la muestra.
- El límite de detección de la prueba debe ser establecido por cada laboratorio teniendo en cuenta todas las variables involucradas.

ix. Análisis de los resultados cuantitativos

Para calcular el número de copias del genoma viral por reacción de RT-qPCR, se utilizan las ecuaciones de regresión lineal obtenidas de las curvas estándar. Usando la ecuación lineal, el número de copias de ARN se obtiene para las muestras investigadas de manera automática, a través del software disponible en el termociclador. Estos valores son exportados a una hoja de cálculo para que podamos estimar la cantidad de copias del genoma viral por mililitro (mL) de muestra de agua residual. Este valor se obtiene considerando el volumen de muestra de ARN agregado a la reacción de qPCR, la dilución utilizada del preparado de la solución de ARN (p. ej. 0.1x), y el volumen de muestra de agua residual que se filtró, usando la siguiente ecuación (1):

$$(1) \quad CV_{muestra} = CG_{rxn} \times \frac{1}{VM_{rxn}} \times \frac{1}{FD} \times \frac{VE}{VD}$$

Donde:

CV_{muestra}, carga viral o concentración de SARS-CoV-2 en copias de genoma por mililitro de agua residual.

CG_{rxn}, copias del genoma de SARS-CoV-2 por reacción de RT-qPCR.

VM_{rxn}, volumen de muestra (preparado de ARN) adicionado a la reacción de RT-qPCR.

FD, factor de dilución del preparado de ARN agregado a la reacción.

VE, volumen de elución o volumen total del preparado de ARN.

VF, volumen de muestra de agua residual filtrada para la purificación de ARN.

El siguiente es un ejemplo de determinación del número de copias por mililitro de agua residual (resultado final):

- El resultado de la reacción de RT-qPCR fue $9,5 \times 10^1$ copias del genoma de SARS-CoV-2.
- Se adicionó 5 μL de muestra a la reacción, sin dilución.
- El volumen de elución (en la purificación de ARN) fue 100 μL .
- El volumen de agua residual filtrado fue 50 mL.

Reemplazando en la ecuación (1):

$$CV_{\text{muestra}} = 9,5 \times 10^1 \text{ (CG/rxn)} \times 1/5 \mu\text{L} \times 1/1 \times 100 \mu\text{L}/50 \text{ mL} = 3,8 \times 10^1 \text{ copias/mL}$$

x. Control de calidad de los resultados

Para garantizar la confiabilidad de los resultados, es importante observar los siguientes aspectos relacionados a los procedimientos generales de análisis para experimentos cuantitativos y cualitativos:

- Se debe realizar un análisis cuidadoso de cada corrida de PCR, de acuerdo con los principios teóricos de la técnica qPCR. El umbral debe colocarse en el punto correspondiente a la máxima eficiencia dentro de la fase exponencial y debe configurarse para cada combinación de cebador y sonda. Por lo tanto, la función 'Auto Threshold' debe estar deshabilitada.
- Para los experimentos con Curva Estándar Absoluta, se debe verificar los valores de la pendiente, intersección Y, R2 y eficiencia. Se desea un valor de pendiente = $-3,3 \pm 10\%$ (100%); una intersección con el eje Y entre 33 - 37 y un $R2 \geq 0,99$; así como una eficiencia entre 90% y 110%. El correcto posicionamiento del Umbral en la fase exponencial y el correcto análisis de la línea de base son fundamentales para obtener resultados cuantitativos confiables.
- Para el análisis de las réplicas (triplicados técnicos), lo ideal es que la desviación estándar del C_q sea como máximo 0,5. Si es más grande, se recomienda repetir el RT-qPCR de la muestra. Observe si no hay inhibidores en la muestra o si ocurrió algún problema durante la extracción. En el caso de los inhibidores, se sugiere diluir la muestra y repetir el análisis.

8. Aspectos del plan de monitoreo

8.1. Recursos necesarios

Para elaborar un plan de monitoreo se requiere lo siguiente:

a. Data de la red de alcantarillado:

- Mapa georreferenciado (en paquete GIS) de los colectores e interceptores de la red de alcantarillado, junto con la topografía del territorio cubierto por dichas redes, e información sobre las direcciones de flujo y caudal de diseño de los colectores.
- Ubicación de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARs).
- Mapa georreferenciado (en paquete GIS) de las áreas de drenaje de las aguas residuales por colectores y por PTAR, para verificar la cobertura de los puntos seleccionados.
- Número de conexiones domiciliarias por distrito y por colector.
- Contribución de residuos industriales (horas, caudales, tipos, etc.)
- Población estimada conectada a la red de alcantarillado por distrito y por área de drenaje.
- Consumo per cápita de agua potable.

b. Data de la población:

- Ubicación de zonas industriales, instalaciones proveedoras de servicios de salud (hospitales, postas médicas y similares), y zonas de alto comercio en el mapa de la red de alcantarillado de cada ámbito de estudio (aprovechando la información de vías y calles provistas en los mapas).
- Datos de la población total que vive en cada distrito, según el INEI.
- Estructura o clasificación socioeconómica de contribuyentes a la red de alcantarillado por domicilio o sector.
- Disponibilidad de servicios de agua potable y saneamiento para la población.

c. Data del sector Salud

- Conteos diarios de casos confirmados, incluyendo por PCR, prueba de antígenos y pruebas serológicas, según MINSA.
- Conteos diarios de fallecidos confirmados, según SINADEF.
- Ocupación de camas UCI y de hospitalización en zona COVID, según MINSA.

Respecto a recursos humanos, se requiere un especialista en ingeniería sanitaria, ingeniería civil o ingeniería ambiental, que conozca procesos relacionados al funcionamiento y diseño en redes de alcantarillado, tratamiento de aguas residuales y monitoreo de cuerpos de agua. Es crítico que esté familiarizado con conceptos de ingeniería hidráulica, y con el uso de Sistemas de Información Geográfica (GIS).

Por otro lado, para el diseño del plan de monitoreo se requiere, además, un profesional con conocimientos en epidemiología, que esté familiarizado con la data generada por el sector salud. Deberá poder extraer y contextualizar la data del sector salud, y data poblacional en general, para la definición de los puntos de monitoreo.

8.2. Diseño del plan de monitoreo

El diseño del plan de monitoreo consiste en definir lo siguiente:

- Ubicación de los puntos de monitoreo;
- rangos horarios para la toma de muestra;
- tipo y composición de la muestra; y
- frecuencia de monitoreo.

Para la selección de los puntos de monitoreo, se analiza la información sobre la red de alcantarillado, la información poblacional y los indicadores del sector salud, mencionados en la sección anterior. Se ponderan los siguientes criterios:

- Distritos o localidades con mayor incidencia de la COVID-19. Se recomienda usar la data de defunciones del SINADEF por tener menos sesgos de selección, información y confusión.
- Puntos de monitoreo en colectores primarios que representan las áreas de drenaje más importantes, considerando la distribución porcentual de conexiones por cada distrito a cada colector primario.
- Buzones en colectores primarios cercanos a los límites distritales de interés, que ofrezcan las mejores condiciones logísticas para una toma de muestra segura y libre de interacción con otras áreas de drenaje.
- Para la selección de las PTARs, es preferible PTARs con un mayor caudal de contribución.
- En el caso de las PTARs pequeñas, considerar que su área de drenaje esté acotada a localidades o distritos, y que una alta proporción de la población en esas localidades esté conectada a la red de alcantarillado.
- Considerar al menos 1 punto de monitoreo en colectores con áreas de drenaje correspondientes a distritos de alta vulnerabilidad social o con población contribuyente de bajo nivel socioeconómico.
- Considerar al menos 1 punto de monitoreo en una zona de ingreso a la ciudad (p. ej. aeropuertos).
- Considerar al menos 1 punto de monitoreo en zonas con alto turismo.
- Considerar al menos 1 punto de monitoreo en zonas con alta actividad comercial (p. ej. mercados de abasto).
- Considerar puntos de monitoreo en zonas que descargan agua residual sin tratamiento a aguas recreacionales (p. ej. mar, río).
- Considerar aspectos logísticos tales como accesibilidad al buzón o la PTAR, seguridad en la zona circundante, riesgo de contaminación a la población local por la apertura de buzones, entre otras.

Para la toma de muestra en colectores, se recomienda seleccionar al menos 3 buzones contiguos, para verificar su idoneidad en visitas a campo.

Una vez seleccionados los puntos de monitoreo en gabinete, se debe hacer una verificación en campo. En estas visitas se determina:

- Para las PTARs, se define el lugar donde se hará la toma de muestra. Se debe considerar (1) que se logre la mayor representatividad, (2) que sea de fácil acceso, (3) que las condiciones de las aguas residuales en el punto seleccionado sean idóneas (es decir, verificar si recibió algún tratamiento, si son áreas de mezcla de diferentes contribuyentes, si la velocidad del caudal de entrada permite una fácil toma de la muestra). El lugar de monitoreo seleccionado se debe mantener constante a lo largo del estudio.
- Para los colectores, se define el buzón más idóneo del cual se hará la toma de muestra. Se debe verificar (1) la operatividad del buzón seleccionado, (2) la accesibilidad para la toma de muestra con ubicación georreferenciada, (3) la profundidad del colector, (4) la velocidad de flujo, (5) las condiciones de tránsito vehicular y (6) la cantidad de personas alrededor que pudieran quedar afectadas por una apertura prolongada del buzón. El buzón seleccionado se debe mantener constante a lo largo del estudio.
- En campo se verifica el equipamiento disponible y/o requerido para hacer la colecta de la muestra. Por ejemplo, se verifica si se cuenta con muestreadores automáticos, o si se requiere colecta manual de la muestra. También, se verifica si se cuenta con equipos de refrigeración cercanos y accesibles, o si se requiere portar cajas térmicas para el periodo de colecta.

8.3. Tipo de muestra y frecuencia

Una vez establecidos los puntos de monitoreo, verificados en campo, se determinan los días y horarios para la toma de muestras en los colectores y las PTAR. Las muestras para el análisis de SARS-CoV-2 deben ser muestras compuestas. De preferencia, estas deberán estar conformadas por muestras simples colectadas con una periodicidad horaria, por un periodo de 24 h. De no poder realizar colectas por 24 horas, se pueden hacer colectas diurnas por intervalos menores. **Como mínimo, se debe coleccionar muestra compuesta por un periodo de 4 horas, con muestras simples colectadas de manera horaria.**

Respecto al volumen de muestra, se deben coleccionar muestras simples de al menos 500 mL. Con estas, se prepara la muestra compuesta. Para el análisis de SARS-CoV-2 se requiere una muestra compuesta de 1 L.

Finalmente, para establecer la frecuencia de monitoreo, se debe considerar lo siguiente:

- Los periodos de colecta preexistentes de las muestras compuestas en las PTARs. Siempre que sean periodos de 24 h, estos se pueden mantener.
- Las horas de mayor generación de aguas residuales y los horarios de mayor generación de descargas fecales por parte de la población. De no poder coleccionar muestra compuesta de 24 h, se debe programar las colectas, por ejemplo, durante las mañanas. Se entiende que en este periodo se da una mayor descarga fecal y hay menos movilización de personas.

- Las horas de generación de residuos industriales. En lo posible, se debe evitar recolectar muestras en periodos en los que se conoce que hay una mayor contribución de residuos industriales.
- La capacidad operativa del laboratorio. Se debe programar la colecta de las muestras de modo que el número de muestras colectadas por día puedan ser procesadas de manera inmediata. Se recomienda que las muestras de aguas residuales se filtren dentro de las 48 horas desde que fueron recolectadas. Estas muestras deben ser mantenidas en refrigeración (< 8oC) en todo momento. No se recomienda congelar las muestras sin filtrar. La muestra filtrada, mantenida en solución de preservación, puede ser mantenida en congelación (a -20oC) por varios meses, y/o transportada a laboratorios en otras localidades, sea por tierra o avión.
- De ser posible, se recomienda recolectar al menos 2 muestras por semana por cada punto de monitoreo; no obstante, esto dependerá de los recursos disponibles. Como mínimo, se recomienda recolectar al menos 1 muestra por semana en cada punto de monitoreo.
- **Una vez definido el día, rango horario, y frecuencia de monitoreo, esta se debe mantener constante a lo largo del estudio.**

9. Aspectos del registro, procesamiento e interpretación de resultados para divulgación

Es importante tener un buen sistema para el registro y procesamiento de la información generada en los análisis. Se recomienda tener una matriz digital en la que se registre como mínimo, la siguiente información:

a. Sobre la colecta de la muestra

- Código de la muestra (registrado en la botella con la muestra y en la ficha de campo).
- Lugar donde se colectó la muestra.
- Fecha de colecta de la muestra.
- Fecha de recepción de la muestra en el laboratorio.
- Persona responsable de la colecta de la muestra.
- Parámetros medidos en campo (pH, conductividad, temperatura).
- Otras observaciones relacionadas a la muestra (p. ej. color u olor anómalo, averías en el equipo muestreador, presencia inusual de sedimentos, desviaciones en el manejo de la temperatura, y cualquier otra observación que pueda tener un impacto en el análisis e interpretación de los resultados).

b. Sobre el proceso de filtración

- Código de la muestra (registrado en la botella con la muestra y en la ficha de campo).
- Fecha en la que se realiza la filtración.
- Tipo, lote, y fecha de suspensión de la vacuna, conteniendo el virus usado como control de recuperación (p. ej. BRSV).
- Volumen de muestra filtrado.
- Analista que realiza la filtración.
- Observaciones relacionadas al proceso de filtración (p. ej., alguna desviación del protocolo, dificultades en la filtración de la muestra, u otra que pueda impactar los resultados).

c. Sobre el proceso de purificación de ARN

- Código de la muestra (registrado en la botella con la muestra y en la ficha de campo).
- Fecha en la que se realiza la purificación de ARN.
- Número de lote del reactivo utilizado (sea TRIzol o el kit NucleoSpin RNA Stool).
- Rendimiento de la extracción (p. ej., en nanogramos por microlitro (ng/μL)).
- Volumen de elución (μL)
- Tasa de absorbancia A260/A280 y A260/A230 (proporcionadas por el NanoDrop, estas indican pureza del preparado de ARN).
- Persona que realiza la purificación de ARN.
- Observaciones relacionadas al proceso de purificación de ARN.

d. Sobre el proceso de amplificación por RT-qPCR

- Código de la muestra (registrado en la botella con la muestra y en la ficha de campo).
- Fecha de amplificación
- Volumen de muestra adicionado a la reacción (μL)
- Factor de dilución utilizado (si es que se diluye el preparado de ARN adicionado a la reacción de RT-qPCR), p. ej. 0,1 (1/10); 0,2 (1/5); 0,5 (1/2).
- Lote del reactivo de PCR utilizado.
- Nombre de la persona que ejecuta el ensayo.
- Observaciones pertinentes a la ejecución del ensayo, si la hubiera.
- Resultados cualitativos para los controles y las muestras problema. Se suele usar '+' cuando se detecta la secuencia diana, y '-' cuando no se detecta la secuencia diana, indicado para cada réplica técnica. Por ejemplo, si se detecta la secuencia diana en las 3 réplicas técnicas, se registra como +++. Si se detecta la secuencia diana sólo en una de las tres réplicas, se registra como -+-.
- Conclusión de resultados cualitativos (ver Tabla 11).
- Resultados del control de inhibición.
- Resultados cuantitativos (copias por reacción y C_q de cada reacción de RT-qPCR)

e. Sobre los cálculos

Para realizar los cálculos de carga viral, además de la información registrada en los pasos previos, se requiere la siguiente información:

- Caudal promedio en L/h registrado durante todo el tiempo de muestreo.
- Tiempo de muestreo (p. ej. 24h o 4h)
- Número de personas que aportan al área de drenaje correspondiente al punto de muestreo.

Con la información colectada, se calculan los siguientes indicadores:

i. Carga viral en la muestra. Este valor representa la concentración de SARS-COV-2 detectada en las aguas residuales. Se presenta como copias del genoma del SARS-CoV-2 (CG) por mililitro (mL) de agua residual. Es el valor más directo, obtenido en el laboratorio mediante el ensayo de RT-qPCR. Se calcula con base a la cuantificación de la región N1 o la región N2 del genoma de SARS-CoV-2. Con este valor se pueden graficar curvas de tendencia o gráficos de barra de la evolución de la concentración del SARS-COV-2 detectada en las aguas residuales en el tiempo. Específicamente, la concentración del SARS-CoV-2 en muestras de agua residual se calcula de la siguiente manera (ecuación 1):

$$(1) \quad CV_{muestra} = CG_{rxn} \times \frac{1}{VM_{rxn}} \times \frac{1}{FD} \times \frac{VE}{VD}$$

Donde:

CV_{muestra}, carga viral o concentración de SARS-CoV-2 en copias de genoma por mililitro de agua residual.

CG_{rxn}, copias del genoma de SARS-CoV-2 por reacción de RT-qPCR.

VM_{rxn}, volumen de muestra (preparado de ARN) adicionado a la reacción de RT-qPCR.

FD, factor de dilución del preparado de ARN agregado a la reacción.

VE, volumen de elución o volumen total del preparado de ARN.

VF, volumen de muestra de agua residual filtrada para la purificación de ARN.

ii. Logaritmo en base 10 de la carga viral en la muestra. Este valor es una transformación de la concentración de SARS-COV-2 detectada en las aguas residuales, en copias de genoma del SARS-CoV-2 (CG) por litro (L). Se utiliza para facilitar la visualización espacial de la carga viral en cada área de drenaje, y poder hacer seguimiento en el tiempo. Este indicador se desarrolló siguiendo el modelo del proyecto Sarsaigua para la ciudad de Barcelona (disponible en <https://sarsaigua.icra.cat/>).

iii. Carga viral por área de drenaje. Este valor se presenta como copias del genoma de SARS-CoV-2 (CG) por día para el área de drenaje correspondiente al punto de monitoreo. Se usa para hacer comparaciones entre la carga viral de SARS-CoV-2 presente en la población de cada ámbito de estudio. Para este indicador se utiliza exclusivamente la data de carga viral estimada para los puntos de monitoreo en PTARS, debido a que en estos puntos se hace una medición precisa del caudal de ingreso del agua residual y el monitoreo se realiza por 24 horas. Este indicador se calcula de la siguiente manera:

$$CV \text{ por AD} \text{ por día} = CV \text{ en la muestra} \left(\frac{CG}{L} \right) \times \text{Caudal promedio} \left(\frac{L}{H} \right) \times 24h$$

Donde:

CV, carga viral.

AD, área de drenaje.

CG, copias del genoma de SARS-CoV-2.

iv. Carga viral por 100.000 habitantes. Este valor representa una estimación de la carga viral por individuo infectado, desarrollado siguiendo el modelo del 'coronadashboard' desarrollado por el Gobierno de Holanda (disponible en <https://coronadashboard.government.nl/landelijk/rioolwater>). Con este valor se desarrolla curvas de tendencia de la evolución de la población potencialmente infectada con el SARS-COV-2, con base en la detección de este virus en las aguas residuales. Se usa también para hacer comparaciones entre la carga viral de SARS-CoV-2 presente en la población de cada ámbito de estudio con indicadores epidemiológicos relacionados al grado de incidencia de la COVID-19, tales como número de muertes totales según SINADEF, número de casos confirmados (según datos oficiales del sector salud). Este indicador se calcula de la siguiente manera:

$$CV \text{ por } 100.000 \text{ habitantes} = \frac{CV \text{ por área de drenaje}}{\text{Población contribuyente al área de drenaje}} \times 100.000$$

Donde:

CV, carga viral.

CG, copias del genoma de SARS-CoV-2.

v. Estimación de la población infectada por COVID-19. Las estimaciones de las poblaciones infectadas se realizan a partir de las cargas virales cuantificadas en las aguas residuales afluentes a las PTARs, considerando una carga viral per cápita equivalente a 2×10^7 número de copias de ARN viral (material genético) por persona por día (equivalente a 10^5 copias de números de ARN viral por gramo de heces por día). Para estimar la carga viral per cápita se considera un aporte fecal de 200 g por persona por día. El indicador de número de personas infectadas estimado a partir de la medición del SARS-CoV-2 en aguas residuales se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Nro de personas infectadas} = \frac{\text{CV por AD por día}}{2 \times 10^7}$$

Donde:

CV, carga viral.

AD, área de drenaje.

Se recomienda tomar este valor con cautela pues parte de varios supuestos que podrían diferir sustancialmente con la realidad. Por ejemplo, fuentes de incertidumbre a esta medición podrían ser la fisiología específica de cada persona, sus hábitos sanitarios, la severidad de la infección en cada persona, el consumo de agua per cápita, la presencia de afluentes pluviales, la densidad poblacional en el área de drenaje, la temperatura en los colectores, la distancia que recorren las muestras desde su generación hasta las PTARs, entre otros.

f. Sobre el reporte

En nuestro laboratorio manejamos una matriz online en la que la información de cada muestra se organiza en filas. Todos los cálculos arriba indicados están programados en esta matriz, y protegidos de manipulación externa. Los reportes se generan automáticamente, alimentando una plantilla predefinida con la información mantenida en la matriz, usando fórmulas y códigos.

En los reportes se recomienda incluir, como mínimo, la siguiente información:

- Código unívoco del reporte.
- Fecha de emisión del reporte.
- Información de la muestra. Debe permitir la trazabilidad de la muestra analizada. Se recomienda incluir lo siguiente:
 - Código de la muestra.
 - Nombre del punto de monitoreo.
 - Ubicación georreferenciada del punto de monitoreo (p. ej. usando coordenadas UTM).
 - Localidad en la que se encuentra el punto de monitoreo (p. ej. distrito y ciudad).

- Código del buzón (si aplica).
- Fecha de monitoreo.
- Persona responsable del monitoreo.
- Información del ensayo. Debe permitir la trazabilidad de la ejecución del ensayo. Se recomienda incluir lo siguiente:
 - Fecha de filtración de la muestra
 - Volumen filtrado.
 - Fecha de purificación del ARN
 - Método utilizado para la purificación del ARN
 - Fecha de amplificación por RT-qPCR
 - Persona responsable del ensayo de laboratorio (es la persona que ejecuta y/o supervisa todo el trabajo).
- Resultados. Se recomienda incluir lo siguiente:
 - Resultado de la purificación de ARN (p. ej. concentración de ARN en ng/μl, o ARN total obtenido en μg): No es indispensable presentar este resultado, pero puede ser útil, para asistir la discusión de los resultados de la RT-qPCR.
 - Resultado cualitativo de la RT-qPCR: Se debe indicar si el genoma del virus SARS-CoV-2 fue detectado, no detectado, o si no se puede concluir (p. ej. si algún control no tuvo los resultados esperados, si no hay consistencia en los resultados de las réplicas técnicas, entre otros).
 - Resultado cuantitativo de la RT-qPCR: Como mínimo, se debe reportar la concentración del virus en copias de genoma por mL de agua residual. Se puede presentar el resultado de algún otro indicador de carga viral, según se requiera.
 - Se debe indicar, en el reporte de laboratorio, el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) del método. Estos valores se determinan durante la validación del método implementado en cada laboratorio.
- Discusión y conclusiones. Estas deben ser emitidas por personal competente. Se debe indicar claramente que son interpretaciones de los resultados, mas no los resultados mismos del ensayo.
- Firma de la persona responsable.

10. Consideraciones finales

Esta guía ofrece una serie de procedimientos y pautas para la implementación exitosa, segura y confiable del monitoreo del SARS-CoV-2 en aguas residuales. Los procedimientos y pautas generales aquí descritos pueden ser usados para la detección de otros biomarcadores biológicos en muestras de agua residual. Para transferir estos procedimientos a la detección de otros biomarcadores, se debe consultar la bibliografía científica (p. ej. artículos en revistas científicas indexadas revisadas por pares, o guías consensuadas por la comunidad científica internacional).

En el proceso de análisis de las aguas residuales existen componentes con diferente grado de complejidad (ver Anexo 4). Esto se debe tomar en consideración cuando se decida implementar los ensayos. Por ejemplo, para el trabajo de campo no se requiere personal con habilidades especializadas. La ejecución de los monitoreos puede ser realizada por

operadores luego de un entrenamiento por personal competente. Para ello, lo más importante es observar las condiciones de seguridad y el manejo de la temperatura. Luego, el trabajo de laboratorio también tiene 2 grados distintos de complejidad. Por un lado, la preparación de materiales y la filtración de las muestras son procesos relativamente sencillos, que requieren un mínimo entrenamiento e infraestructura para su ejecución adecuada. Por otro lado, el trabajo de biología molecular para la purificación de ácidos nucleicos y análisis por RT-qPCR sí son experimentos que requieren personal con alta habilidad técnica. Sobre todo, el RT-qPCR es una prueba que, si no se realiza por personas con entrenamiento avanzado, pueden dar resultados no confiables.

Una alternativa para facilitar la implementación de esta herramienta a nivel nacional es tener 2 tipos de grupos ejecutores: aquellos abocados a la colecta y filtración de las muestras y otros abocados a la purificación de los ácidos nucleicos y análisis por RT-qPCR. En el proyecto trabajado por nuestro equipo, se adaptó infraestructura y se entrenó a un equipo de campo en la ciudad de Arequipa, para que realicen la colecta de las muestras y la filtración. Las muestras filtradas eran enviadas en solución de preservación a nuestro laboratorio de biología molecular en la ciudad de Lima. Se optimizó este proceso, el cual permitió procesar muestras de ambas ciudades de manera óptima y confiable. Este esquema de trabajo se podría replicar para otras localidades donde no se cuente laboratorios de biología molecular especializados.

11. Recomendaciones

Algo muy importante que se debe tener en cuenta en este tipo de desarrollos es que la información científica se actualiza constantemente. Las pautas y procedimientos presentados en esta guía se basan en la literatura científica disponible hasta el momento. Es posible que nuevos y mejores métodos y tecnologías se desarrollen en el futuro. Por ello, se recomienda que todo grupo que implemente monitoreo de aguas residuales para la determinación de SARS-CoV-2 u otro bioindicador se mantenga al día con la literatura científica. Así mismo, es importante que cada variación o nueva metodología que se desee implementar sea validada. Como mínimo, se debe verificar límite de detección, límite de cuantificación, robustez y precisión de las pruebas. Especificidad es un parámetro requerido para cuando el laboratorio desarrolla pruebas propias, que no han sido validadas por la comunidad científica internacional.

Otra recomendación es que, en lo posible, se implementen sistemas informáticos para el registro y trazabilidad de la data de los ensayos. Esto facilita también los cálculos y la emisión de los resultados.

Finalmente, se recomienda participar en conferencias, congresos, o reuniones científicas que abarquen la temática de epidemiología basada en aguas residuales. Apoyarse en la comunidad de pares que realizan estos trabajos permite resolver dificultades o dudas en las interpretaciones de los resultados y/o en los procedimientos. Al mismo tiempo, participar en estos foros permite mantenerse actualizado, conocer el estado del arte de este tipo de trabajos.

12. Anexos

ANEXO 1

GUÍA DE CODIFICACIÓN DE MUESTRAS¹⁰

Estructura General:

TTCcNN-YYY-AAAA.MM.DD

Donde:

TT, corresponde al tipo de punto de monitoreo. PT, para PTAR. CO, para colectores.

Cc, corresponde al nombre de la ciudad donde se realiza el monitoreo. Lm, para Lima. Ar, para Arequipa.

NN, corresponde al número del punto de monitoreo. Los números se asignan correlativamente, según se vayan determinando en el plan de monitoreo, y se resumen en las Tablas A.1; A.2 y A.3.

YYY, iniciales de la persona que realiza el monitoreo. Se usan 3 letras correspondiente al nombre y apellido(s).

AAAA.MM.DD, corresponde a la fecha en la que se realiza el monitoreo en el formato año.mes.día.

Nota: Si una misma persona realiza toma de muestra en el mismo punto de monitoreo en el mismo día, se puede agregar número correlativo al final del código para poder diferenciar las muestras.

Tabla A.1. Códigos de identificación de puntos de monitoreo en PTARS

Nro.	PTAR	Distrito, Ciudad	Coordenadas UTM (WGS84)
1	Taboada	Callao, Callao	267931 (X); 8673107 (Y)
2	La Chira	Chorrillos, Lima	279167 (X); 8649657 (Y)
3	Puente Piedra	Puente Piedra, Lima	271206 (X); 8677741 (Y)
4	San Juan	San Juan de Miraflores, Lima	285707 (X); 8652744 (Y)
5	Ventanilla	Ventanilla, Lima	266421 (X); 8687679 (Y)
6	La Escalerilla	Cerro Colorado, Arequipa	219187 (X); 8188684 (Y)
7	La Enlozada	Tibya, Arequipa	220491 (X); 8176654 (Y)

¹⁰ La lista de códigos para los puntos de monitoreo se irá actualizando conforme se consolide el plan de monitoreo.

Tabla A.2. Códigos de identificación de puntos de monitoreo en Colectores en Lima Metropolitana

Nro.	Colector	Distrito, Ciudad	Coordenadas UTM (WGS84)
1	Colector Canto Grande	San Juan de Lurigancho, Lima	280938 (X); 8669332 (Y)
2	Colector Comas	San Martín de Porres, Lima	269810 (X); 8673885 (Y)
3	Isabel la Católica	La Victoria, Lima	279798 (X); 8664950 (Y)
4	Villa María	Villa María del Triunfo	286179 (X); 8655354 (Y)
5	Costanero	Magdalena, Lima	275529 (X); 8661486 (Y)
6	La Marina	Pueblo Libre, Lima	275270 (X); 8663220 (Y)
7	La Molina	La Molina, Lima	287232 (X); 8664167 (Y)
8	Chosica	Chaclacayo, Lima	301720 (X); 8673879 (Y)
9	Nuevo Centenario	Callao, Callao	268283 (X); 8669550 (Y)

Tabla A.3. Códigos de identificación de puntos de monitoreo en Colectores en Arequipa Metropolitana

Nro.	Colector	Distrito, Ciudad	Coordenadas UTM (WGS84)
1	Colector 83	Arequipa, Arequipa	230373 (X); 8185305 (Y)
2	Colector 56	Arequipa, Arequipa	227806 (X); 8183314 (Y)
3	Arrayanes	Arequipa, Arequipa	227687 (X); 8184041 (Y)
4	Colector 73	Arequipa, Arequipa	228125 (X); 8178539 (Y)

Ejemplos:

- **PTLm01-BPF-2021.02.09:** Muestra colectada en la PTAR Taboada, en Lima Metropolitana, por Braulio Pardo Figueroa, el 9 de febrero del 2021.
- **COLm01-BPF-2021.02.09:** Muestra colectada en el Colector Canto Grande en San Juan de Lurigancho (Coordenadas UTM (WGS84) 280937 Este (X), 8669301 Norte (Y)), en Lima Metropolitana, por Braulio Pardo Figueroa, el 9 de febrero del 2021.

ANEXO 2

FICHA DE CAMPO

Información General

Código de la muestra					
Código del multiparámetro					
Profundidad del colector (m)					
Hora Inicio		Hora Fin		Hora Retorno	
T oC Inicio*		T oC Fin*		T oC Retorno*	

* Temperatura de la caja térmica donde se almacena la muestra de análisis. Retorno, llegada al laboratorio.

Información del muestreo

# muestra simple	Hora	Profundidad* (cm)	Ancho* (cm)	T oC	pH	Cond.	Observaciones
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							

* Profundidad y ancho de la lámina de agua (para estimar el caudal)

Otras observaciones y comentarios:

Firma del encargado del monitoreo

Firma del encargado del transporte de la muestra

Firma del encargado de la recepción de la muestra

ANEXO 3

SECUENCIAS DE CEBADORES, SONDAS Y CONTROLES USADOS EN LOS ENSAYOS DE RT-qPCR

- A.** Secuencia de cebadores, sondas y controles utilizados para evaluar la recuperación de material genético viral en muestras de aguas residuales:

RB94-977 5'-GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT-3'

RB94-1076 5'-ACACTGTAATTGATGACCCCATCT-3'

RB94-probe 5'-FAM-ACCAAGACTTGTATGATGCTGCCAAAGCA-TAMRA-3'

> Gblock BRSV-NGene

GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAATGGGTGAGTATAGAGGTACACCAAGAAACCAAGACTTGTAT
GATGCTGCCAAAGCATATGCAGAACAATAAAGAGAATGGGGTCATCAATTACAGTGT

- B.** Secuencia de cebadores, sondas y controles utilizados para evaluar la presencia de inhibidores de la PCR para el análisis de SARS-CoV-2 en muestra de aguas residuales.

SketaF2 5'-GGTTTCCGCAGCTGGG-3'

SketaR3 5'-CCGAGCCGTCCTGGTC-3'

SketaP2 [6-FAM]-5'-AGTCGCAGGCGCCACCGT-TAMRA-3'

> Gblock O.keta-ITS2

GGTTTCCGCAGCTGGGGCAGTCGCAGGCGGCCACCGTGCAGCCTTCGTCCTCCCTAAGTTCAGAC
CAGGACGGCTCGG

- C.** Secuencia de cebadores, sondas y controles utilizados para evaluar la calidad del ARN viral para el análisis de SARS-CoV-2 en muestra de aguas residuales.

PMMV-FP1-F 5'-GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA-3'

PMMV-FP1-R 5'-TTGTCGGTTGCAATGCAAGT-3'

PMMV-Probe1 [5-HEX]-5'-CCTACCGAA[ZEN]GCAAATG[3-IABkFQ]-3'

> Gblock PMMoV-16.9

GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGGAGAGGCCTACCGAAGCAAATGTCGCACTTGCATTGCAACCGA
CAATT

- D. Secuencias de cebadores, sondas y controles utilizados para la detección del SARS-CoV-2, de acuerdo con la CDC (Center for Disease Control and Prevention, 2019). Se utilizaron colores para diferenciar y localizar la secuencia de cada cebador dentro del genoma del virus.

2019-nCoV_N1-F2019-nCoV_N1 GACCCCAAATCAGCGAAAT

2019-nCoV_N1-R2019-nCoV_N1 TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG

2019-nCoV_N1-P2019-nCoV_N1 ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC

2019-nCoV_N2-F2019-nCoV_N2 TTACAAACATTGGCCGCAA

2019-nCoV_N2-R2019-nCoV_N2 GCGCGACATTCCGAAGAA

2019-nCoV_N2-P2019-nCoV_N2 ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG

RP-F_RNAseP_Forward AGATTTGGACCTGCGAGCG

RP-R_RNAseP_Reverse GAGCGGCTGTCTCCACAAGT

RP-P_RNAseP_Probe TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG

>2019-nCoV_N_Positive Control:

ATGTCTGATAATG

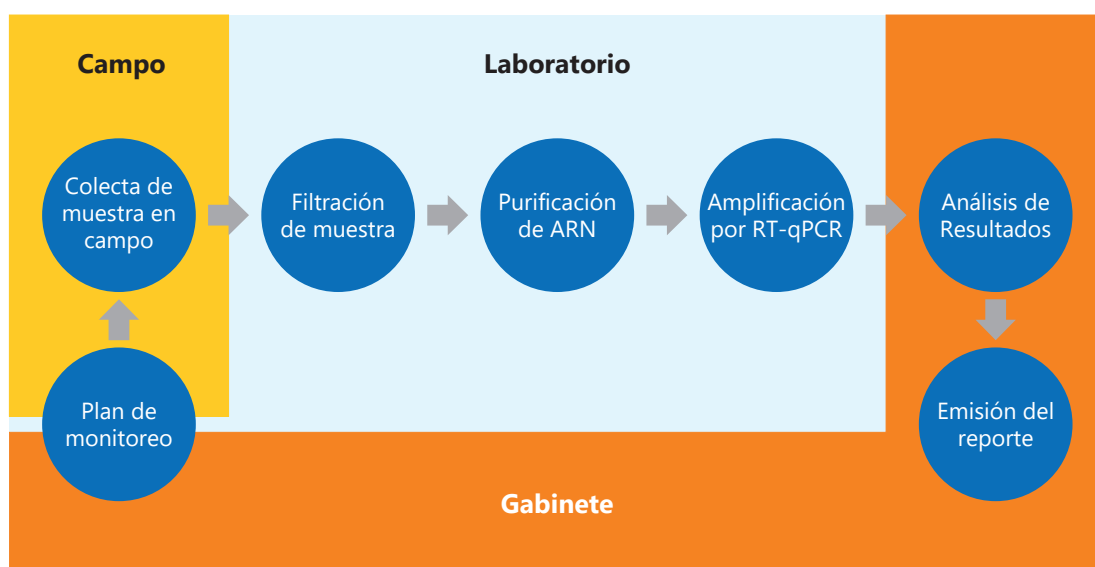
GACCCCAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCCTCAGATTCAACTGGCAGT
AACCAGAAATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAAACAACGTCGGCCCCAAGGTTTACCCAATA
ATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTAAATCCCTCGAGGAC
AAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCAGATGACCAAATTTGGCTACTACCGAAGAGCTACC
AGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGTATTCTACTACCTA
GAACTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAAC
TGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCT
GCAATCGTGCTACA ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGC
AGAGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCCTCATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATCAACT
CCAGGCAGCAGTAGGGGA ACTTCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGC
TTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAATGTCTGGTAAAGGCCAACAAACAAC
AAGGCCAAACTGTCACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAACGTA
GCTACTGCTACTAAAGCATAAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCCAGAACAACCCAAAGGAA
ATTTTGGGGACCAGGA ACTAATCAGACAAGGAAGTATTACAAACATTGGCCGCAAATTCACAA
TTTGCCCCAGCGCTTACGCGTTCTTCGGAATGTCGCGCATTGGCATGGAAGTACACCTTCGGG
AACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAATTTGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAG
TCATTTTGGCTGAATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTTCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACA
AAAAGAAGAAGGCTGATGAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAA ACTGTGA
CTCTTCTCCTGCTGCAGATTGGATGATTTCTCAAACAATTGCAACAATCCATGAGCAGTGCTGA
CTCAACTCAGGCCTAA

Hs_RPP30_Positive Control

CCCGTGAAAAACGACGGCCAGTTTATCTAGTCAGCTTGATTCTAGCTGATCGTGACCGGAAGGTG
AGCCAGTGAGTTGATTGCAGTCCAGTTACGCTGGAGTCTGAGGCTCGTCCTGAATGATATGCGGCC
TCGGACTTCAGCATGGCGGTGTTTGCAGATTTGGACCTGCGAGCGGGTTCTGACCTGAAGGCTCT
GCGCGGACTTGTGGAGACAGCCGCTCACCGTGAGTTGCGGTCTCCCAGAGTCTCTGGGATGTCCC
TGGAGGCTGATGGCGCGTGATCTTACGGCATTATACGTATGATCGGTCCACGATCAGCTAGATTATC
TAGTCAGCTTGATGTCATAGCTGTTTCTGAGGCTCAATACTGACCATTAAATCATACTGACCTCC
ATAGCAGAAAAGTCAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTACTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCA
ACTTTCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGTAGTTATCGAGATTTTCAGGAGC
TAAGGAAGCTAAAATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGC
CTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
ACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTACGCCCGAAG
AACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGTATGTGGCGCGGATTATCCCGTATTGACGC
CGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAG
TCACAGAAAAGCATCTCACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATG
AGTGATAAACAAGTGCAGCAACTTACTTCTGGCAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTT
TTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA
TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTA
ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGT
TGCAGGATCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG
TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGCATCGTAG
TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGT
GCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGGCCCAAATGTAATCACCTGGCTCACCTTCGGGTGGGC
CTTTCTTGAGGACCTAAATGTAATCACCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCCTTCTGCGTTGCTGGCG
TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGATGCTCAAGTCAGAGGTGGCG
AAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCGTTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAA
GACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTAT
CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAC
CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
AAGAAGATCCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCCCA

ANEXO 4

MAPA DEL PROCESO DE ANÁLISIS DE SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES



13. Referencias

- Adriaenssens, E. M., Farkas, K., Harrison, C., Jones, D. L., Allison, H. E., & McCarthy, A. J. (2018). Viromic analysis of wastewater input to a river catchment reveals a diverse assemblage of RNA viruses. *MSystems*, 3(3).
- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J. W., . . . Li, J. (2020). First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Science of The Total Environment*, 138764.
- Ahmed, W., Bertsch, P., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., . . . McMinn, B. R. (2020). Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment*, 139960.
- Ahmed, W., Bivins, A., Bertsch, P. M., Bibby, K., Choi, P. M., Farkas, K., . . . Kitajima, M. (2020). Surveillance of SARS-CoV-2 RNA in wastewater: Methods optimisation and quality control are crucial for generating reliable public health information. *Current opinion in environmental science & health*.
- Ahmed, W., Harwood, V. J., Gyawali, P., Sidhu, J. P. S., & Toze, S. (2015). Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 2042-2049.
- Annalaura, C., Ileana, F., Dasheng, L., & Marco, V. (2020). Making waves: Coronavirus detection, presence and persistence in the water environment: State of the art and knowledge needs for public health. *Water Research*, 115907.
- Aquino de Carvalho, N., Stachler, E. N., Cimabue, N., & Bibby, K. (2017). Evaluation of Phi6 persistence and suitability as an enveloped virus surrogate. *Environmental science & technology*, 51(15), 8692-8700.
- Asghar, H., Diop, O. M., Weldegebriel, G., Malik, F., Shetty, S., El Bassioni, L., . . . Adeniji, A. J. (2014). Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *The Journal of infectious diseases*, 210(suppl_1), S294-S303.
- Barril, P. A., Pianciola, L. A., Mazzeo, M., Ousset, M. J., Jaureguiberry, M. V., Alessandrello, M., . . . Oteiza, J. M. (2020). Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters. *Science of The Total Environment*, 756, 144105.
- Berchenko, Y., Manor, Y., Freedman, L. S., Kaliner, E., Grotto, I., Mendelson, E., & Huppert, A. (2017). Estimation of polio infection prevalence from environmental surveillance data. *Science translational medicine*, 9(383).
- Bivins, A., Greaves, J., Fischer, R., Yinda, K. C., Ahmed, W., Kitajima, M., . . . Bibby, K. (2020). Persistence of SARS-CoV-2 in water and wastewater. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(12), 937-942.

Boxus, M., Letellier, C., & Kerkhofs, P. (2005). Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of virological methods*, 125(2), 125-130.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Bustin, S. A., & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109(4), 365-379.

Centers for Disease Control and Prevention, R. V. B. D. o. V. D. (2020). 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time rRT-PCR panel primers and probes. *DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES*, 24.

Chen, C., Gao, G., Xu, Y., Pu, L., Wang, Q., Wang, L., . . . Wang, L. (2020). SARS-CoV-2-positive sputum and feces after conversion of pharyngeal samples in patients with COVID-19. *Annals of internal medicine*.

Chen, C., Kostakis, C., Gerber, J. P., Tschärke, B. J., Irvine, R. J., & White, J. M. (2014). Towards finding a population biomarker for wastewater epidemiology studies. *Science of the total environment*, 487, 621-628.

Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., . . . Wei, Y. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, 395(10223), 507-513.

Chernicharo, C. A. L., Araújo, J. C., Mota Filho, C. R., Bressani-Ribeiro, T., Chamhum-Silva, L. A., Leal, C. D., . . . Ayrimoraes, S. R. (2020). Sewage Monitoring As An Epidemiological Surveillance Tool To Control Covid-19: A Case Study In The City Of Belo Horizonte. *Revista ESA especial Covid-19, Artigo 1*.

Collivignarelli, M. C., Collivignarelli, C., Miino, M. C., Abbà, A., Pedrazzani, R., & Bertanza, G. (2020). SARS-CoV-2 in sewer systems and connected facilities. *Process safety and environmental protection*.

Crits-Christoph, A., Kantor, R. S., Olm, M. R., Whitney, O. N., Al-Shayeb, B., Lou, Y. C., . . . Hinkle, A. (2021). Genome sequencing of sewage detects regionally prevalent SARS-CoV-2 variants. *MBio*, 12(1), e02703-02720.

Daughton, C. G. (2001). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: overarching issues and overview. In. ACS Publications.

Daughton, C. G. (2012). Using biomarkers in sewage to monitor community-wide human health: Isoprostanes as conceptual prototype. *Science of the total environment*, 424, 16-38.

Daughton, C. G. (2020). Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. *Science of The Total Environment*, 139631.

Dawood, F. S., Iuliano, A. D., Reed, C., Meltzer, M. I., Shay, D. K., Cheng, P.-Y., . . . Buchy, P. (2012). Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *The Lancet infectious diseases*, 12(9), 687-695.

Dublineau, A., Batéjat, C., Pinon, A., Burguière, A. M., Leclercq, I., & Manuguerra, J.-C. (2011). Persistence of the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in water and on non-porous surface. *PLoS One*, 6(11), e28043.

Elsamadony, M., Fujii, M., Miura, T., & Watanabe, T. (2021). Possible transmission of viruses from contaminated human feces and sewage: Implications for SARS-CoV-2. *Science of The Total Environment*, 755, 142575.

Farkas, K., Adriaenssens, E. M., Walker, D. I., McDonald, J. E., Malham, S. K., & Jones, D. L. (2019). Critical evaluation of CrAssphage as a molecular marker for human-derived wastewater contamination in the aquatic environment. *Food and environmental virology*, 11(2), 113-119.

Farkas, K., Hillary, L. S., Malham, S. K., McDonald, J. E., & Jones, D. L. (2020). Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19. *Current Opinion in Environmental Science & Health*.

Foladori, P., Cutrupi, F., Segata, N., Manara, S., Pinto, F., Malpei, F., . . . La Rosa, G. (2020). SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: what do we know? A review. *Science of the Total Environment*, 743, 140444.

Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(2), 357-371.

Fongaro, G., Silva, H. D. d., Elmahdy, E. M., Magri, M. E., Schissi, C. D., Moreira, M., . . . Barardi, C. R. M. (2015). Enteric viruses as contaminants and bioindicators in environmental samples.

Fumian, T. M., Vieira, C. B., Leite, J. P. G., & Miagostovich, M. P. (2013). Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of water and health*, 11(1), 110-119.

Gerba, C. P., Betancourt, W. Q., Kitajima, M., & Rock, C. M. (2018). Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. *Water research*, 133, 282-288.

Gerrity, D., Papp, K., Stoker, M., Sims, A., & Frehner, W. (2021). Early-pandemic wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in Southern Nevada: Methodology, occurrence, and incidence/prevalence considerations. *Water research X*, 10, 100086.

Girones, R., Ferrus, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Correia, A., . . . Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water research*, 44(15), 4325-4339.

- Gonzalez, R., Curtis, K., Bivins, A., Bibby, K., Weir, M. H., Yetka, K., . . . Gonzalez, D. (2020). COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water research*, 186, 116296.
- Guerrero-Latorre, L., Ballesteros, I., Villacrés-Granda, I., Granda, M. G., Freire-Paspuel, B., & Ríos-Touma, B. (2020). SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. *Science of the Total environment*, 743, 140832.
- Gundy, P. M., Gerba, C. P., & Pepper, I. L. (2009). Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food and Environmental Virology*, 1(1), 10.
- Gupta, S., Parker, J., Smits, S., Underwood, J., & Dolwani, S. (2020). Persistent viral shedding of SARS-CoV-2 in faeces—a rapid review. *Colorectal Disease*.
- Hamza, I. A., & Bibby, K. (2019). Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. *Journal of virological methods*, 266, 11-24.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J. R., Masago, Y., Sano, D., & Katayama, H. (2018). A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water research*, 135, 168-186.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ito, T., & Ohgaki, S. (2009). Development of virus concentration methods for detection of koi herpesvirus in water. *Journal of fish diseases*, 32(3), 297-300.
- Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., & Kitajima, M. (2020). First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *medRxiv*.
- Haugland, R. A., Sieftring, S. C., Wymer, L. J., Brenner, K. P., & Dufour, A. P. (2005). Comparison of Enterococcus measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water research*, 39(4), 559-568.
- Hellmér, M., Paxéus, N., Magnus, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., . . . Norder, H. (2014). Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Applied and environmental microbiology*, 80(21), 6771-6781.
- Hovi, T., Shulman, L. M., Van Der Avoort, H., Deshpande, J., Roivainen, M., & De Gourville, E. M. (2012). Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiology & Infection*, 140(1), 1-13.
- Jafferali, M. H., Khatami, K., Atasoy, M., Birgersson, M., Williams, C., & Cetecioglu, Z. (2021). Benchmarking virus concentration methods for quantification of SARS-CoV-2 in raw wastewater. *Science of The Total Environment*, 755, 142939.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.

Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1033-1039.

Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C. P., Hamilton, K. A., . . . Rose, J. B. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of The Total Environment*, 139076.

Kitajima, M., Sassi, H. P., & Torrey, J. R. (2018). Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *NPJ Clean Water*, 1(1), 1-9.

Kocamemi, B. A., Kurt, H., Hacıoglu, S., Yarali, C., Saatci, A. M., & Pakdemirli, B. (2020). First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey. *medRxiv*.

Kojima, K., Bennett, A., Blacksell, S., Heisz, M., Makison Booth, C., McKinney, M., & Summermatter, K. (2020). Laboratory biosafety manual.

La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, P., Ferraro, G. B., Veneri, C., Bonadonna, L., . . . Suffredini, E. (2020). First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of The Total Environment*, 139652.

Lescure, F.-X., Bouadma, L., Nguyen, D., Parisey, M., Wicky, P.-H., Behillil, S., . . . Le Hingrat, Q. (2020). Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet Infectious Diseases*.

Lesimple, A., Jasim, S. Y., Johnson, D. J., & Hilal, N. (2020). The role of wastewater treatment plants as tools for SARS-CoV-2 early detection and removal. *Journal of Water Process Engineering*, 101544.

Louten, J. (2016). Virus structure and classification. *Essential Human Virology*, 19.

Lu, D., Huang, Z., Luo, J., Zhang, X., & Sha, S. (2020). Primary concentration—The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *Science of The Total Environment*, 747, 141245.

Maal-Bared, R., Brisolara, K., Munakata, N., Bibby, K., Gerba, C., Sobsey, M., . . . Sherchan, S. (2020). Implications of SARS-CoV-2 on current and future operation and management of wastewater systems. *Water Environment Research*.

Mallapaty, S. (2020). How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. *Nature*, 580(7802), 176-177.

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. *Current Opinion in Environmental Science & Health*.

Medema, G., Been, F., Heijnen, L., & Petterson, S. (2020). Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Environmental Science & Health*.

Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., & Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters*.

Metcalf, T. G., Melnick, J. L., & Estes, M. K. (1995). Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annual review of microbiology*, 49(1), 461-487.

Mizumoto, K., Kagaya, K., Zarebski, A., & Chowell, G. (2020). Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance*, 25(10), 2000180.

Mohapatra, S., Menon, N. G., Mohapatra, G., Pisharody, L., Pattnaik, A., Menon, N. G., . . . Barman, M. K. (2020). The novel SARS-CoV-2 pandemic: Possible environmental transmission, detection, persistence and fate during wastewater and water treatment. *Science of The Total Environment*, 142746.

Mota, C., Calábria, J., Ayrimoraes, S., Tullius, M., & Chernicharo, C. (2020). Metodologia para concentração e quantificação do novo coronavírus em amostras de água e esgoto por técnicas moleculares. In *Nota Técnica*. Minas Gerais, Brazil: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Estações de Tratamento de Esgotos Sustentáveis.

Mota, C. R., Bressani-Ribeiro, T., Araújo, J. C., Leal, C. D., Leroy-Freitas, D., Machado, E. C., . . . Chamhum-Silva, L. (2021). Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. *Water Research*, 202, 117388.

Nemudryi, A., Nemudraia, A., Wiegand, T., Surya, K., Buyukyoruk, M., Cicha, C., . . . Wiedenheft, B. (2020). Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *Cell Reports Medicine*, 1(6), 100098.

Nishi, A., Dewey, G., Endo, A., Neman, S., Iwamoto, S. K., Ni, M. Y., . . . Young, S. D. (2020). Network interventions for managing the COVID-19 pandemic and sustaining economy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(48), 30285-30294.

Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2002). Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of virological methods*, 104(2), 217-225.

Or, I. B., Yaniv, K., Shagan, M., Ozer, E., Erster, O., Mendelson, E., . . . Nir, O. (2020). Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance. *medRxiv*.

Paul, J. R., & Trask, J. D. (1941). The virus of poliomyelitis in stools and sewage. *Journal of the American Medical Association*, 116(6), 493-498.

Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D. E., Grubaugh, N. D., Kaplan, E. H., Casanovas-Massana, A., . . . Wang, M. (2020). Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nature Biotechnology*, 38(10), 1164-1167.

Pinon, A., & Vialette, M. (2018). Survival of viruses in water. *Intervirology*, 61(5), 214-222.

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

Prado, T., Fumian, T. M., Mannarino, C. F., Maranhão, A. G., Siqueira, M. M., & Miagostovich, M. P. (2020). Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. In (Vol. 115): *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

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

Prussin, A. J., Belser, J. A., Bischoff, W., Kelley, S. T., Lin, K., Lindsley, W. G., . . . Bibby, K. (2020). Viruses in the Built Environment (VIBE) meeting report. In: BioMed Central.

Quilliam, R. S., Weidmann, M., Moresco, V., Purshouse, H., O'Hara, Z., & Oliver, D. M. (2020). COVID-19: The environmental implications of shedding SARS-CoV-2 in human faeces. *Environment International*.

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 Research*, 115942.

Rico, M., Andrés-Costa, M. J., & Picó, Y. (2017). Estimating population size in wastewater-based epidemiology. Valencia metropolitan area as a case study. *Journal of hazardous materials*, 323, 156-165.

Sick, P. G. (2020). Interim laboratory biosafety guidelines for handling and processing specimens associated with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention*.

Sims, N., & Kasprzyk-Hordern, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment international*, 105689.

Sinclair, R. G., Choi, C. Y., Riley, M. R., & Gerba, C. P. (2008). Pathogen surveillance through monitoring of sewer systems. *Advances in applied microbiology*, 65, 249.

Singer, A. C., Järhult, J., Grabic, R., Fedorova, G., Khan, G. A., Fick, J., . . . Söderström, H. (2012). Compliance to Oseltamivir among two populations in Oxfordshire, United Kingdom affected by Influenza A (H1N1) pdm09.

- Suo, T., Liu, X., Feng, J., Guo, M., Hu, W., Guo, D., . . . Wang, X. (2020). ddPCR: a more sensitive and accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *medRxiv*.
- Symonds, E. M., Verbyla, M. E., Lukasik, J. O., Kafle, R. C., Breitbart, M., & Mihelcic, J. R. (2014). A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water research*, *65*, 257-270.
- Teixeira, D. M., Spada, P. K. d. P., Morais, L. L. C. d. S., Fumian, T. M., de Lima, I. C. G., Oliveira, D. d. S., . . . Mascarenhas, J. D. A. P. (2017). Norovirus genogroups I and II in environmental water samples from Belém city, Northern Brazil. *Journal of Water and Health*, *15*(1), 163-174.
- Tian, Y., Rong, L., Nian, W., & He, Y. (2020). gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *51*(9), 843-851.
- Torrey, J., von Gunten, U., & Kohn, T. (2019). Differences in viral disinfection mechanisms as revealed by quantitative transfection of Echovirus 11 genomes. *Applied and environmental microbiology*, *85*(14), e00961-00919.
- Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *Jama*, *323*(18), 1843-1844.
- Wigginton, K. R., Ye, Y., & Ellenberg, R. M. (2015). Emerging investigators series: the source and fate of pandemic viruses in the urban water cycle. *Environmental Science: Water Research & Technology*, *1*(6), 735-746.
- Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., . . . Qu, X. (2020). Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, *5*(5), 434-435.
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J.-M., & Moulin, L. (2020). Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. *MedRxiv*.
- Xiao, F., Sun, J., Xu, Y., Li, F., Huang, X., Li, H., . . . Zhao, J. (2020). Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerging infectious diseases*, *26*(8), 1920.
- Ye, Y., Ellenberg, R. M., Graham, K. E., & Wigginton, K. R. (2016). Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environmental science & technology*, *50*(10), 5077-5085.
- Zhang, N., Gong, Y., Meng, F., Bi, Y., Yang, P., & Wang, F. (2020). Virus shedding patterns in nasopharyngeal and fecal specimens of COVID-19 patients. *MedRxiv*.
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., & Fanelli, R. (2008). Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environmental health perspectives*, *116*(8), 1027-1032.
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Calamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., & Fanelli, R. (2005). Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environmental Health*, *4*(1), 14.

