



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Evaluación de métodos de purificación de SARS-CoV-2 para la cuantificación viral y análisis NGS de muestras del alcantarillado de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa durante la pandemia de COVID-19

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

AUTOR

Elías Ismael MINDREAU GANOZA

ASESORES

Débora Elizabeth ALVARADO IPARRAGUIRRE

Mónica Cecilia SANTA MARÍA FUSTER (Coasesora)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mindreau, E. (2023). *Evaluación de métodos de purificación de SARS-CoV-2 para la cuantificación viral y análisis NGS de muestras del alcantarillado de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa durante la pandemia de COVID-19*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas/Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Elías Ismael Mindreau Ganoza
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41259268
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5282-0906
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07576929
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2191-1618
Datos del co-asesor	
Nombres y apellidos	Mónica Cecilia Santa María Fuster
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	18226712
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4789-7444
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Mario Alcarraz Curi
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	31159746
Miembro del jurado 1	

Nombres y apellidos	Tito Libio Sánchez Rojas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08550935
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Miguel Ángel Francisco Talledo Rivera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25625144
Datos de investigación	
Línea de investigación	1.06.03
Grupo de investigación	CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA DELAGUA (CITA) - UTEC
Agencia de financiamiento	Cooperación Suiza – SECO, a través del Fondo de Asistencia Técnica (SECOSAN) y el Programa de Incentivos GenLab 2021 (Gen Lab del Perú SAC)
Ubicación geográfica de la investigación	Perú, Lima, Lima, Barranco https://goo.gl/maps/bL2u3DFdeHip1Fmq9?co h=178573&entry=tt
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021-2022
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Virología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.02 Ciencias del medio ambiente https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.05.08



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 231v-UPG-FCB-2022

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)**

Siendo las 11:00 horas del día Lunes 15 de mayo de 2023, en Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace meet.google.com/tmv-hokk-iii, el Jurado de Tesis conformado por:

Mg. Mario Alcarraz Curi	(Presidente)
Dr. Tito libio Sánchez Rojas	(Miembro)
Mg. Miguel Ángel Francisco Talledo Rivera	(Miembro)
Mg. Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el señor Bachiller Don **ELÍAS ISMAEL MINDREAU GANOZA**

Después de darse lectura al **Expediente N° 231v-UPG-FCB-2022**, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

“Evaluación de métodos de purificación de SARS-CoV-2 para la cuantificación viral y análisis NGS de muestras del alcantarillado de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa durante la pandemia de COVID-19”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: MUY BUENO con la nota de dieciocho (18)

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular, al señor Bachiller **ELÍAS ISMAEL MINDREAU GANOZA**.

Siendo las 12:40 pm horas, se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día lunes 15 de mayo del año 2023.

.....
Mg. Mario Alcarraz Curi
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE
malcarrazc@unmsm.edu.pe
RENACYT P0003853

.....
Mg. Débora E. Alvarado Iparraguirre
Profesora Principal D.E.
ASESORA
dalvaradoi@unmsm.edu.pe
RENACYT P0000427

.....
Dr. Tito Libio Sánchez Rojas
Profesor Asociado T.C.
MIEMBRO
tsanchezr@unmsm.edu.pe
RENACYT P0002130

.....
Mg. Miguel Ángel F. Talledo Rivera
Profesor Asociado T.C.
MIEMBRO
mtalledor@unmsm.edu.pe



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. Facultad: CIENCIAS BIOLÓGICAS
2. UNIDAD DE POSGRADO
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad:
Evaluadores de la originalidad de los documentos de investigación conducentes a los grados académicos de la UPG (RD N° 564-D-FCB-2018):
_ Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
_ Dra. Mónica Arakaki Makishi
4. Apellidos y Nombres de la autoridad académica: Dra. Liz Erika Cruz Pio, Directora de la Unidad de Posgrado
5. Operador del Programa Informático de Similitudes:
_ Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
X Dra. Mónica Arakaki Makishi
6. Documento evaluado: "VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SARS-COV-2 EN EL ALCANTARILLADO DE LAS CIUDADES DE LIMA, CALLAO Y AREQUIPA POR MEDIO DE LA TÉCNICA MOLECULAR RT-qPCR DURANTE LA PANDEMIA DE COVID-19"
7. Tesis para Grado Académico de: Magíster en Biología Molecular
8. Autor del documento:
Apellidos: MINDREAU GANOZA
Nombres: ELÍAS ISMAEL
9. Fecha de recepción de documento: 02 de diciembre de 2022
10. Fecha de aplicación del programa informático de similitud:
02 de diciembre de 2022
11. SOFTWARE UTILIZADO
- Turnitin
12. Configuración del programa detector de similitudes
X Excluye texto entrecomillado
X Excluye bibliografía
X Excluye cadenas menores a 40 palabras
- Otros criterios (especificar)
13. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes
- Porcentaje en letras y números: OCHO por ciento de similitud (8%)
14. Fuentes originales de las similitudes encontradas
- Indicarlas en decreciente y su respectivo porcentaje: Se adjunta Informe respectivo
15. Observaciones
Ninguna
16. Calificación de originalidad
- Documento cumple criterios de originalidad, según la normativa del VRIP.
17. Fecha del informe
1° Informe: 02 de diciembre de 2022
2° Informe: 04 de diciembre de 2022

DRA. MONICA ARAKAKI MAKISHI
Miembro Evaluador

DRA. LIZ ERIKA CRUZ PIO
Directora de la Unidad de Posgrado

Agradecimientos y dedicatorias

Esta tesis está dedicada a mi perro Coco, quien fue mi soporte emocional durante las cuarentenas y aislamiento social de la pandemia de COVID-19 y cuando me contagié de la enfermedad, siendo que me acompañó lealmente durante esta difícil época, lo cual fue siempre continua inspiración para mi estudio y para mantenerme enfocado en culminar la maestría y obtener el grado, es así que le rindo homenaje con mi trabajo.

El primer proyecto “Desarrollo de una herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo de aguas residuales desde el sector saneamiento”, del que surgió esta tesis, fue coordinado y ejecutado por la Universidad de Ingeniería y Tecnología - UTEC, a través del apoyo técnico y financiero del Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento- MVCS y del apoyo técnico del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología de Plantas de Tratamiento Sustentable de Aguas Residuales (INCT ETEs) - Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Lima - SEDAPAL, y Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Arequipa - SEDAPAR; y la colaboración de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa - UNSA.

El segundo proyecto “Evolución espacio-temporal de variantes de SARS-CoV-2 mediante secuenciación de siguiente generación (NGS) a partir de aguas residuales en Arequipa, Lima y Callao”, del que también surgió esta tesis, complementándola, fue coordinado y ejecutado por la Universidad de Ingeniería y Tecnología - UTEC, a través del programa de incentivos GenLab 2021 que involucró el apoyo técnico y financiero de GenLab del Perú SAC e Illumina Inc.

Contenido

Resumen	IV
<i>Abstract</i>	V
Introducción.....	1
Antecedentes.....	3
Hipótesis y objetivos.....	7
Materiales y Métodos	8
Resultados y discusión	26
Conclusiones.....	39
Recomendaciones.....	41
Referencias Bibliográficas	42
Anexos	53

Resumen

La necesidad de medir los casos de infectados de COVID-19 durante la pandemia en países en vías de desarrollo donde se tienen recursos insuficientes para poder testear a la población ha llevado a proponer la epidemiología basada en aguas residuales como una alternativa económica y viable para poder conocer en tiempo real el avance de contagios y tomar las medidas necesarias de prevención aplicando cálculos de normalización de la población infectada como el del índice de prevalencia relativa (RPI, de sus siglas en inglés, *Relative Prevalence Index*) sabiendo la cantidad de población que alimenta un determinado buzón de alcantarillado.

A partir de dicha herramienta es que se propone optimizar los procedimientos de menor costo para la concentración viral y purificación del ARN del SARS-CoV-2 para las muestras de agua residual, así como poder evaluar el rendimiento del proceso a partir de la medición de parámetros que puedan influir en la detección y cuantificación vía RT-qPCR, como la influencia de los parámetros fisicoquímicos del agua residual recolectada en pozos de Plantas de Tratamiento de Alcantarillado (PTARs) y Redes de Alcantarillado (Colectores).

En el presente estudio se demuestra la importancia del monitoreo de aguas residuales en el seguimiento al SARS-CoV-2, así como la existencia de un efecto favorable del $MgCl_2$ como un aditivo para la filtración mediante el método de elución- adhesión con membrana electronegativa; también se recomienda el método del TRIzol modificado para la extracción a bajo costo del ARN viral de aguas residuales, siendo que es posible hacer más accesible estas metodologías en países de bajos recursos.

PALABRAS CLAVE:

Aguas Residuales; RT-qPCR; Secuenciamiento de Nueva Generación; SARS-CoV-2; Vigilancia Epidemiológica COVID-19

Abstract

The need to measure the cases of those infected with COVID-19 during the pandemic in developing countries where there are insufficient resources to be able to test the population has led to the proposal of wastewater-based epidemiology as an economic and viable alternative to be able to know in real time the progress of infections and take the necessary preventive measures applying normalization calculations of the infected population such as the relative prevalence index (RPI) knowing the amount of population that feeds a given sewer box.

Based on this tool, it is proposed to optimize the least cost procedures for viral concentration and purification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater samples, as well as to be able to evaluate the performance of the process based on the measurement of parameters that may influence the detection and quantification via RT-qPCR, such as the influence of the physicochemical parameters of the wastewater collected in of the wastewater collected in Sewer Treatment Plants (STPs) and Sewer Network (SN) manholes.

This study demonstrates the importance of monitoring wastewater in monitoring SARS-CoV-2, as well as the existence of a favorable effect of $MgCl_2$ as an additive for filtration using the elution-adhesion method with an electronegative membrane; the modified TRIzol method is also recommended for the low-cost extraction of viral RNA from wastewater, since it is possible to make these methodologies more accessible in low-resource countries.

KEYWORDS:

COVID-19 Epidemiological Surveillance; Next Generation Sequencing; RT-qPCR, SARS-CoV-2; Wastewater

1. Introducción

La vigilancia epidemiológica del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) es una herramienta complementaria al estudio clínico de COVID-19 que permite obtener una estimación aproximada en tiempo real de la oscilación de casos de personas infectadas por la enfermedad dentro de una población determinada mediante cálculos de normalización de la población infectada como el índice de prevalencia relativa (RPI) propuesto por Mota y colaboradores (Mota *et al.*, 2021) y aplicado también en el Perú (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022). Esta sigue un protocolo de estudio que parte del muestreo de agua residual para medir cuantitativamente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-qPCR) la carga viral presente en el agua residual gracias al contenido de heces presentes en ella, provenientes de la red de alcantarillado, y que presentan partículas virales que funcionan como bioindicadores de la población infectada variando en menor o mayor concentración de acuerdo al contexto epidemiológico.

Debido a que las muestras de agua residual son una mezcla heterogénea y con una alta carga orgánica, estas deben pasar por un tratamiento previo que permita detectar a nivel molecular la carga viral de SARS-CoV-2, el cual consiste en: Primero, concentrar el virus (por ejemplo, por medio de una filtración), y segundo, purificar dicho contenido para poder extraer el ácido ribonucleico (ARN) del virus; para finalmente poder realizar la detección y cuantificación por medio de RT-qPCR, así como la identificación de variantes por NGS.

Para el estudio epidemiológico de virus en aguas residuales es crítico seleccionar adecuadamente los puntos de monitoreo relevantes a la población contribuyente, la realización de colectas compuestas al momento del muestreo, con el control y registro de los parámetros físico químicos, y posteriormente, el traslado de las muestras al laboratorio salvaguardando la cadena de frío, ya que el ARN es altamente termolábil y se degrada con el calor. También, es necesario llevar a cabo una adecuada optimización y

validación de los procedimientos en el laboratorio para poder llegar a obtener resultados fiables y que cumplan con la significancia estadística. Para ello es importante realizar ensayos con los cuales optimizar el protocolo interno para el estudio de aguas residuales en el laboratorio. Durante la pandemia se ha podido estudiar y perfeccionar precisamente estas metodologías para la detección del virus del SARS-CoV-2 en las aguas residuales y consiguiente aplicación de una “epidemiología basada en aguas residuales” (WBE, de sus siglas en inglés, *Wastewater-Based Epidemiology*).

Los resultados obtenidos por el estudio de la vigilancia epidemiológica de aguas residuales complementan a los estudios clínicos y no son excluyentes a los mismos, más bien son aprovechados como una herramienta complementaria con la cual de ser el caso poder activar alertas tempranas de darse el rebrote de la enfermedad ocasionado por una nuevas ola de COVID-19, o en el caso contrario, poder verificar un descenso de casos en personas infectadas de una población y posible mitigación de la pandemia, para que en cualquiera de los casos las autoridades del sector de la salud pública tengan un mejor criterio para establecer normas de prevención y contener nuevas olas de la enfermedad y muertes como consecuencia de ellas, a través de la implementación de cercos epidemiológicos, o caso contrario, flexibilizar las políticas de contención sanitaria con miras a reactivar las actividades económicas no esenciales de las cuales depende la subsistencia de innumerables familias.

2. Antecedentes

Desde 1940 existe una vigilancia de aguas residuales, la cual empezó con la vigilancia epidemiológica de poliovirus en los Estados Unidos de América (Paul & Trask, 1941). Otros virus entéricos también han ido siendo monitoreados desde entonces, tales como picornavirus, rotavirus, norovirus, adenovirus (Asghar *et al.*, 2014; Hellmér *et al.*, 2014; Berchenko *et al.*, 2017;). Esta vigilancia es posible ya que se basa en los cambios en el tiempo que pueda haber en las concentraciones virales en el alcantarillado (Farkas *et al.*, 2020).

Con la pandemia se dio la oportunidad de aplicar esta vigilancia epidemiológica para la detección del virus SARS-CoV-2 y poder estudiar la prevalencia de la COVID-19 en las poblaciones urbanas, sobre todo por su potencial para generar alertas tempranas y anticiparse al aumento en el número de los contagios dentro de la comunidad (Medema *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2020), debido a que el virus SARS-CoV-2 pudo ser detectado en muestras de agua residual antes que fueran reportados los primeros casos clínicos de COVID-19 al inicio de la pandemia (Farkas *et al.*, 2020; Mallapaty, 2020).

Se ha aplicado en todo el mundo este tipo de investigaciones, por ejemplo, en Australia (Ahmed *et al.*, 2020a), Japón (Haramoto *et al.*, 2020), Estados Unidos (Nemudryi *et al.*, 2020; Peccia *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020), Países Bajos (Medema *et al.*, 2020), Ecuador (Guerrero-Latorre *et al.*, 2020), Argentina (Barril *et al.*, 2020), Brasil (Mota *et al.*, 2021; Prado *et al.*, 2020), entre otros muchos países a nivel mundial.

Perú fue muy afectado por la pandemia al tener el mayor exceso de muertes del mundo por la COVID-19. Se estimaron 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 del 2021, según cifras obtenidas del Sistema Informático Nacional de Defunciones (SINADEF).

La WBE permite dar una alerta temprana para poder mitigar el avance de los contagios en una población, tanto de COVID-19 (Mao *et al.*, 2020), como de otras enfermedades (Farkas *et al.*, 2020). Esto es posible gracias a los estudios realizados de la presencia de virus entéricos en el ciclo urbano del agua (Guerrero-Latorre *et al.*, 2020), y que han podido ser detectados eficazmente (Fongaro *et al.*, 2015). El rango de concentración del virus de SARS-CoV-2 detectada en heces humanas es de $10^{5.6}$ a $10^{8.1}$ copias/g de heces (Lescure *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), y entre 10^5 a $10^{6.5}$ copias de genoma por L de agua residual (Wurtzer *et al.*, 2020).

Si bien se han estudiado más los virus sin envoltura, que son más resistentes que los virus envueltos (Fong & Lipp, 2005) a las abruptas condiciones ambientales, siendo el SARS-CoV-2 un virus envuelto, ha cobrado vigencia investigar cómo es el destino de estos virus en el agua residual y en los cuerpos de agua naturales (Wigginton *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2016; Pinon & Vialette, 2019; Carducci *et al.*, 2020; Kitajima *et al.*, 2020). Se determina además que son más vulnerables por la cubierta lipoproteica que los cubre (Louten *et al.*, 2016).

Así como se ha estudiado al virus de la influenza humana, el H1N1 (Dublineau, 2011) y se ha visto que puede resistir a condiciones adversas ambientales en el agua, se ha estudiado los factores que pueden influir en la supervivencia del SARS-CoV-2, y todos los efectos que pueden provocar su inactivación como la exposición al sol y a la luz ultravioleta, el aumento a una temperatura mayor a 23 °C en el agua (Pinon & Vialette, 2019; Mohapatra *et al.*, 2021; Collivignarelli *et al.*, 2020; Polo *et al.*, 2020), así como la presencia de material orgánico que le ofrezca una superficie adsorbente para ralentizar su degradación en el entorno turbulento del alcantarillado (Gundy *et al.*, 2009).

La detección del virus en el agua residual es posible por su presencia en las heces que ingresan al ciclo urbano del agua por medio de las descargas realizadas en los baños domésticos. Es así que se puede entender esta

presencia en las heces a partir de los estudios realizados en las heces de pacientes infectados (Collivignarelli *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020; F. Wu *et al.*, 2020) donde se confirma la detección de la presencia del virus SARS-CoV-2 en las heces de toda clase de paciente infectado, tanto sintomático como asintomático (Daughton, 2020), presintomático, con o sin síntomas relacionados a alguna afección intestinal, como deposiciones con diarrea o sin estas incluso, todas de igual manera contienen el virus (Wang *et al.*, 2020).

Siendo que está claro que el SARS-CoV-2 está presente en el sistema de alcantarillado ya que ingresa a través de las heces, se ha venido reportando que también tiene una persistencia de varios días a través de estos sistemas de agua residual (Ahmed *et al.*, 2020c). lo cual se ha observado en otros coronavirus, como el coronavirus humano (HCoV), que puede persistir hasta 10 días en aguas residuales primarias, que son aquellas que pasaron remoción de sólidos, y también hasta 5 días en aguas residuales secundarias, que son las que pasaron por tratamiento biológico en las PTARS (Gundy *et al.*, 2009).

El concepto *epidemiología basada en aguas residuales* (WBE) fue desarrollado por Daughton en el año 2001, aplicado para poder monitorear el narcotráfico. Zuccato *et al.* (2005) lo aplicó para rastrear el uso de cocaína y otras drogas ilegales en aguas superficiales de centros urbanos. Es así cómo se explica que la WBE permite detectar diversos componentes tanto químicos, farmacológicos y también biológicos, denominados de manera general biomarcadores (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020).

Al no crecer fuera de la célula hospedera, los virus que son excretados por la población y estando presentes en las aguas residuales en concentraciones relativas, estas no van a aumentar al no haber crecimiento de estos patógenos fuera del ciclo celular, sin embargo, si va a darse una desintegración de sus componentes estructurales por los factores ambientales que los degraden, que se calcula irán actuando progresivamente después de algunos días (Carducci *et al.*, 2020; Kitajima *et*

al., 2020) por lo que irán decayendo las moléculas traza, pero mientras tanto pueden ser detectados y dar información para estudiar la prevalencia viral en el agua residual en el tiempo, permitiendo así generar alertas tempranas de ser el caso de identificarse algún rebrote viral en la población con el aumento en el tiempo de la concentración viral en el agua residual (Adriaenssens *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2020c; Daughton, 2020).

Aplicando la técnica molecular RT-qPCR (de sus siglas en inglés, *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) con la cual se detectan por fluorescencia los genes amplificados más conservados en el genoma del virus SARS-CoV-2, que son los genes estructurales “S” (*Spike*) y “N” (*Nucleocapsid*), mediante el uso de cebadores (Wu *et al.*, 2020, Randazzo *et al.*, 2020), siendo posible la cuantificación de partículas virales en las aguas residuales presentes como biomarcadores de agentes patógenos (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). con estimaciones de los títulos virales (número de copias por mL de aguas residual).

Esta información puede facilitar las decisiones de las autoridades públicas del sector salud para activar la implementación o eliminación de medidas de mitigación como cercos epidemiológicos y cuarentenas, entre otras (Medema *et al.*, 2020; Lesimple *et al.*, 2020).

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

Es posible optimizar la cuantificación del ARN de SARS-CoV-2 obtenido del muestreo de aguas residuales de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa, y la identificación de sus variantes mediante la optimización del tratamiento de dichas muestras.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General:

Evaluar la metodología de concentración y purificación del ARN de SARS-CoV-2 obtenido del muestreo de aguas residuales de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa para el desarrollo de una herramienta de alerta temprana que posibilite conocer la incidencia de la COVID-19.

3.2.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar la metodología de la concentración del ARN de SARS-CoV-2 en las muestras de aguas residuales obtenidas de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa por medio de RT-qPCR y NGS.
- Evaluar la metodología de la purificación de ARN de SARS-CoV-2 para determinar la carga viral de SARS-CoV-2 en las muestras de aguas residuales obtenidas de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa por medio de RT-qPCR y NGS.
- Evaluar el efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la concentración del ARN de SARS-CoV-2 en las muestras de aguas residuales obtenidas de las ciudades de Lima, Callao y Arequipa por medio de RT-qPCR y NGS.

4. Materiales y métodos

4.1 Del documento denominado “Guía instructiva para la detección del SARS-CoV-2 en agua residual” (HELVETAS PERU, 2021), generado para el proyecto “Desarrollo de una herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo de aguas residuales desde el sector saneamiento”, se manejaron los siguientes procedimientos para el desarrollo de la tesis:

4.1.1 Etapas de trabajo manejadas para desarrollar el proyecto

El proyecto se desarrolló en las siguientes etapas:

- (1) Trabajo de campo: Para la toma de las muestras y su traslado al laboratorio;
- (2) Trabajo de laboratorio: Para el tratamiento de las muestras y pruebas de detección, cuantificación y determinación de variantes;
- (3) Trabajo de gabinete: Para el cotejamiento de los resultados obtenidos con los datos del sector salud.

4.1.2 Equipamiento para el proyecto

- Sistema para la obtención de agua tipo III o agua destilada
- Sistema para la obtención de agua tipo I
- Autoclave
- Horno 250 °C
- Cabina de Bioseguridad Clase 2^a
- Lámparas de luz ultravioleta
- Refrigerador de 4 °C +/- 3°C
- Bomba de vacío
- Microcentrífuga
- Espectrofotómetro
- Incubadora de microtubos
- Agitador

- Termociclador (7500 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems)
- Congelador de -20 °C
- Ultracongeladora -80 °C
- Microcentrifuga para tubos de 1,5 mL
- Centrífuga para microplacas
- Cabina de contención para PCR

4.1.3 Protocolos para el procesamiento de las muestras de agua residual en el laboratorio.

Como se detalla a continuación y se puede visualizar en la Figura 1 y Figura 2 se contó con los protocolos para desarrollar el trabajo de campo:

- Los permisos para ingresar a las PTARs y a los colectores (Col) por las autoridades competentes (MVCS y SEDAPAL/SEDAPAR)
- Los materiales y equipamiento de protección personal (EPPs) y formularios requeridos, así como los certificados de vacunación contra la COVID-19 y seguros contra accidentes en el trabajo (SCTR).
- La movilidad para el transporte del personal, equipos y materiales para el muestreo en los puntos de monitoreo.
- Las ubicaciones designadas de los buzones para la toma de muestras según las líneas de alcantarillado relevantes.
- El cerco perimétrico para evitar el riesgo de exponer a los transeúntes, la interrupción y desvío del tráfico vehicular durante el periodo requerido, así como la autorización de apertura de los buzones para las tomas de muestras.

Alistar los frascos de colecta	Acondicionar las neveras	Acondicionar el punto de colecta
		
Enjuagar el balde con agua residual	Enjuagar la jarra con agua residual	Enjuagar los frascos con agua residual
		
Colectar la muestra simple	Medir y anotar los parámetros fisicoquímicos	Medir la profundidad del agua residual en el drenaje
		
Colectar la última muestra	Hacer la muestra compuesta	Enjuagar frasco de muestra compuesta
		

Figura 1. Procedimiento para la colecta de las muestras de agua residual en los puntos de monitoreo en colectores (Col). “Guía instructiva para la detección del SARS-CoV-2 en agua residual” (HELVETAS PERU, 2021)

Mantener la temperatura 2-8 °C con hielo refrigerante	Mantener en sombra o cubierto el muestreador automatizado	Mantener la manguera del muestreador automatizado por encima del nivel del agua residual
		
Programar el muestreador automatizado para la colecta de muestras simples cada hora por 24 horas	Mezclar las 24 muestras simples en una sola muestra compuesta	Extraer 1 Litro de la muestra compuesta y trasladar al laboratorio
		

Figura 2. Procedimiento para la colecta de las muestras de agua residual en los puntos de monitoreo en PTARs. “Guía instructiva para la detección del SARS-CoV-2 en agua residual” (HELVETAS PERU, 2021)

4.1.4 Análisis de las muestras en el laboratorio

Para cuantificar los genomas de SARS-CoV-2 en muestras de agua residual el trabajo se dividió en 3 etapas (como se indica en la Figura 3):

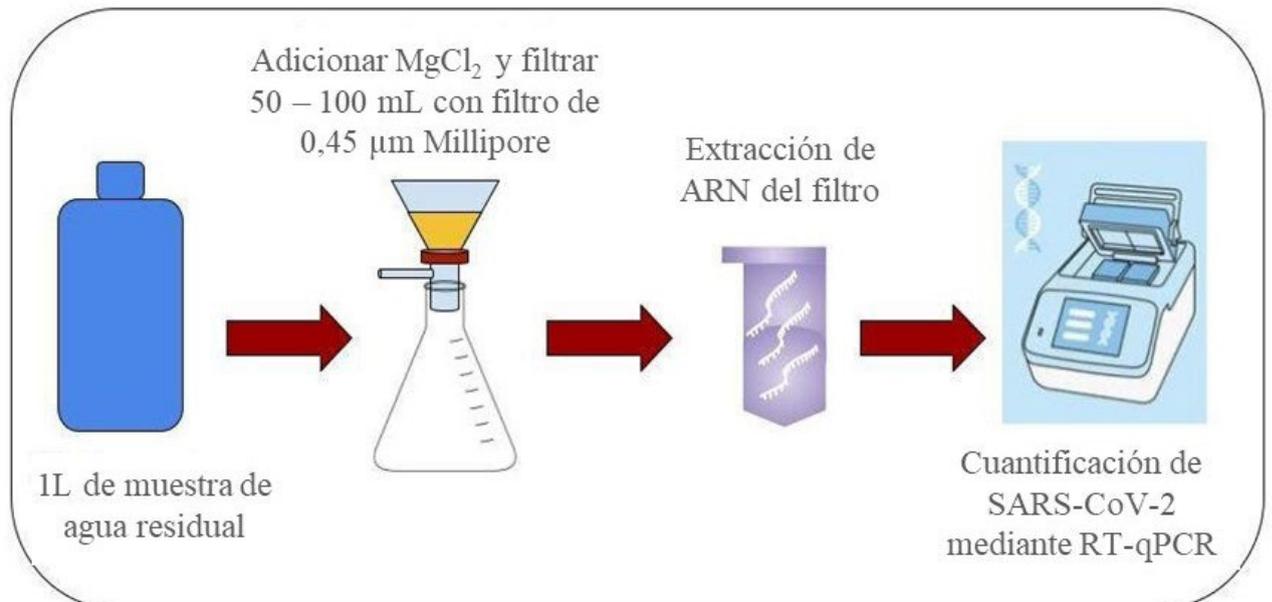


Figura 3. Esquema general del procesamiento para la concentración (filtración del agua residual), purificación (extracción de ARN) y análisis (detección) por RTqPCR del virus del SARS-CoV-2 en muestras de agua residual obtenidas del sistema de alcantarillado. “Guía instructiva para la detección del SARS-CoV-2 en agua residual” (HELVETAS PERU, 2021)

(1) **Captura y concentración de partículas virales por filtración.** Se usó un método de recuperación basado en adsorción-elución en membrana electronegativa, con adición de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 25 mM y a pH neutro (Katayama et al., 2002; Haramoto *et al.*, 2009; Symonds *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2020c) (Figura 4 y Figura 5)

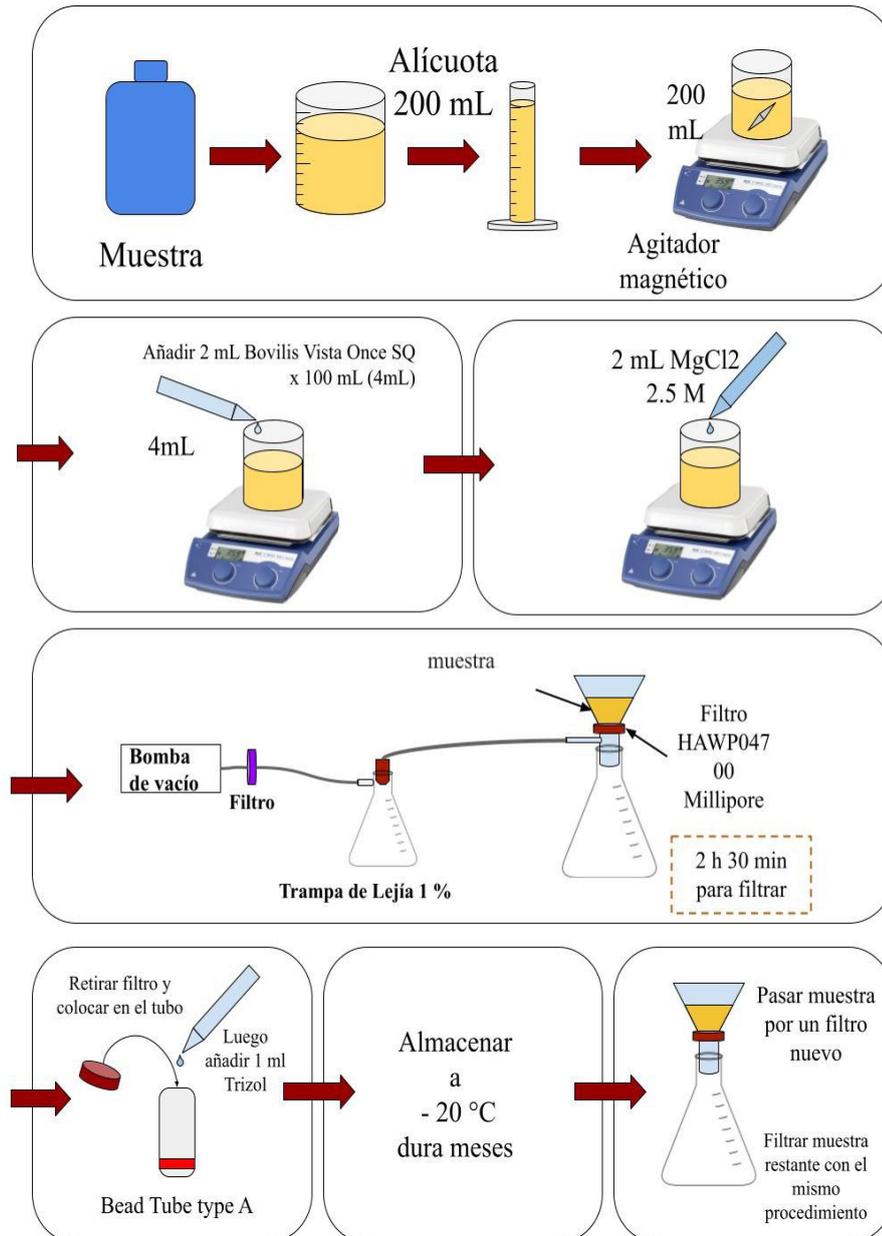


Figura 4. Esquema general del proceso de concentración de virus SARS-CoV-2 de las muestras de agua residual basado en absorción-elución en membranas electro-negativas usado en este proyecto. “Guía instructiva para la detección del SARS-CoV-2 en agua residual” (HELVETAS PERU, 2021)



Figura 5. Ensamblaje del sistema para la filtración de muestras de agua residual. “Guía instructiva para la detección del SARS-CoV-2 en agua residual” (HELVETAS PERU, 2021)

(2) **Purificación del ARN total de la muestra mediante la extracción del material genético purificado.** Se usaron 2 métodos para obtener ARN de alto rendimiento y pureza y con baja presencia de inhibidores de la PCR: el método de TRIzol (TRIzol® salino-Invitrogen™)

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf,

y el método *NucleoSpin® RNA Stool* de Macherey-Nagel <https://www.mn-net.com/media/pdf/fa/c8/ac/Instruction-NucleoSpin-RNA-Stool.pdf>. (Figura 6)

ARN de muestras de heces Protocolo de un vistazo (Rev. 02)

NucleoSpin® RNA Stool

1 Preparar muestra		Tubo de perlas Nucleospin Tipo A 180-220 mg de material de muestra 200 µL de NucleoZol 660 µL de Buffer RST1
2 Lisis de la muestra	 	Agitar horizontalmente por 10 min a RT o usar otro homogenizador de acuerdo al protocolo del fabricante 23,000 x g. 5 min Transferir 510 µL de sobrenadante
3 Precipitar contaminantes	 	140 µL Buffer RST2 Agitar 5 s 13,000 x g. 3 min
4 Filtrar lisado	 	Cargar sobrenadante en la Columna Nucleospin Removedora de Inhibidores (anillo rojo) 13,000 x g. 1 min
5 Ajustar condiciones de unión		180 µL Buffer RST2 o 120 µL Buffer RST2 Agitar 5 s
6 Unir ARN	 	Cargar 600 µL de muestra en la Columna Nucleospin de muestras de heces (anillo azul claro) 13,000 x g. 1 min Cargar muestra remanente 13,000 x g. 1 min
7 Lavar membrana de sílica y digestión de ADN	 	1st 600 µL Buffer RST3 11,000 x g. 30 s
		80 µL de reacción de mezcla rDNAasa RT, 15 min
		2nd 600 µL Buffer RST4 13,000 x g. 1 min
		3rd 600 µL Buffer RST2 13,000 x g. 1 min
4th 600 µL Buffer RST5 13,000 x g. 1 min		
8 Secar membrana de sílica	 	11,000 x g. 2 min
9 Eluir ARN	 	100 µL H ₂ O libre de ARNasa 11,000 x g. 30 s

Figura 6. Esquema general del proceso de extracción de ARN viral a partir de membranas Millipore usando el *kit NucleoSpin® RNA Stool. RNA from stool samples. User manual. NucleoSpin® RNA Stool, 2017*

(3) **Amplificación del genoma viral mediante RT-qPCR.** Se siguieron los procedimientos recomendados por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2020), adaptados para muestras de aguas residuales.

4.2 Del artículo principal del proyecto “Desarrollo de una herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo de aguas residuales desde el sector saneamiento”, el cual se titula: “Vigilancia espacio-temporal del SARS-CoV-2 en las aguas residuales de tres grandes áreas urbanas de Perú: generación de datos valiosos donde las pruebas clínicas son extremadamente limitadas”, se manejaron los siguientes procedimientos para el desarrollo de la tesis, según se extrae del mencionado documento para la misma:

4.2.1 Plan de monitoreo

El plan de monitoreo incluyó puntos de muestreo en pozos de visitas de plantas de tratamiento de aguas residuales o servidas (PTARs) y redes de alcantarillado (Colectores) en las ciudades de Lima, Callao y Arequipa (Tabla 1). Para seleccionar los puntos de muestreo, se consideró: (1) población cubierta; (2) ingreso promedio de la población contribuyente (proporcionado por el Instituto Peruano de Estadística e Informática - INEI); (3) áreas de alto tráfico (distritos con mucho turismo o con mercados importantes); e incidencia de COVID-19, registrada como número total de fallecidos (el indicador más confiable de la pandemia en Perú). En total, se seleccionaron 5 puntos para PTARs y 9 puntos para colectores del Área Metropolitana de Lima-Callao (Figura 7), y 2 PTARs y 2 Colectores para el Área Metropolitana de Arequipa (Figura 8). Más adelante en el estudio, se agregaron dos puntos de monitoreo de colectores adicionales para Arequipa, debido a un aumento pronunciado en los casos de COVID-19 reportados para esa ciudad.

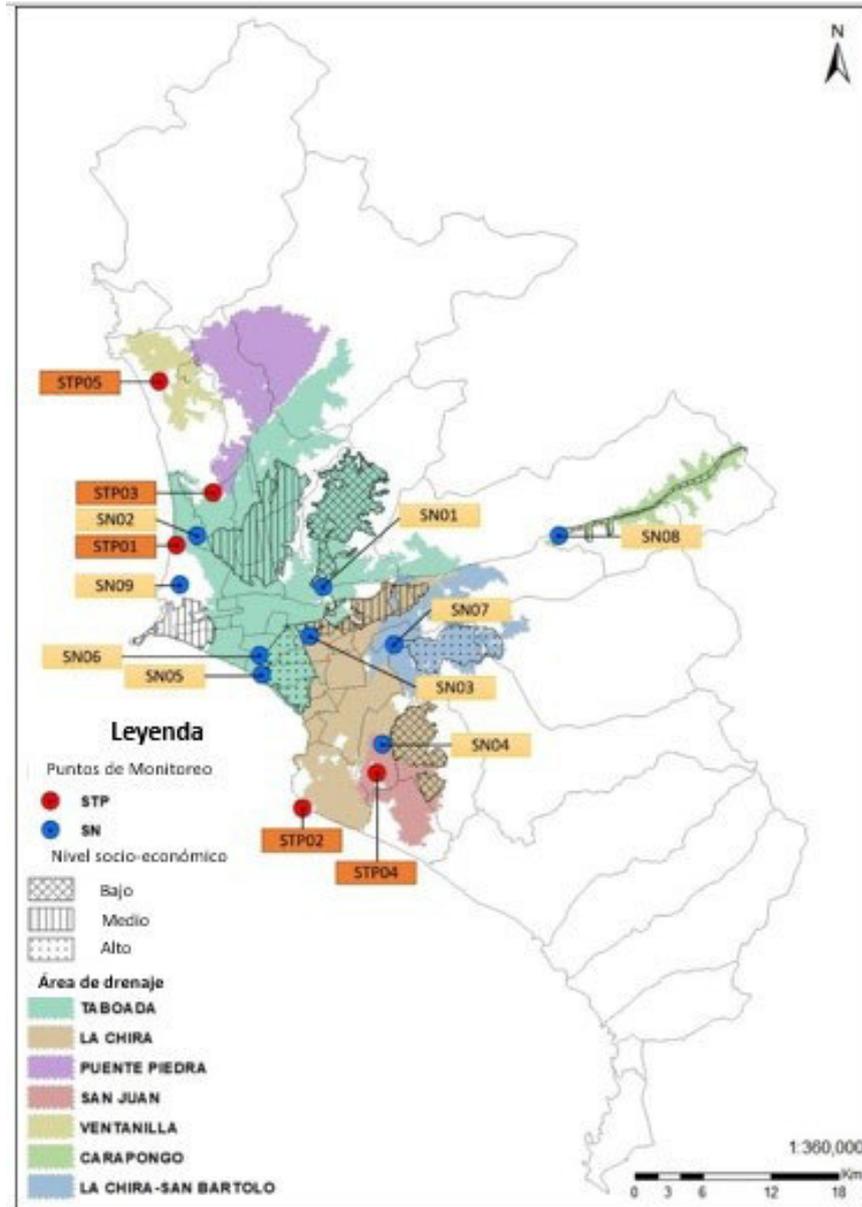


Figura 7. Mapa de las regiones monitoreadas y la ubicación de los puntos de muestreo en las ciudades de Lima y Callao que muestra el nivel de ingresos económicos de las poblaciones contribuyentes. STP: Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR); SN: Buzones de la red de alcantarillado (Col). (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022)

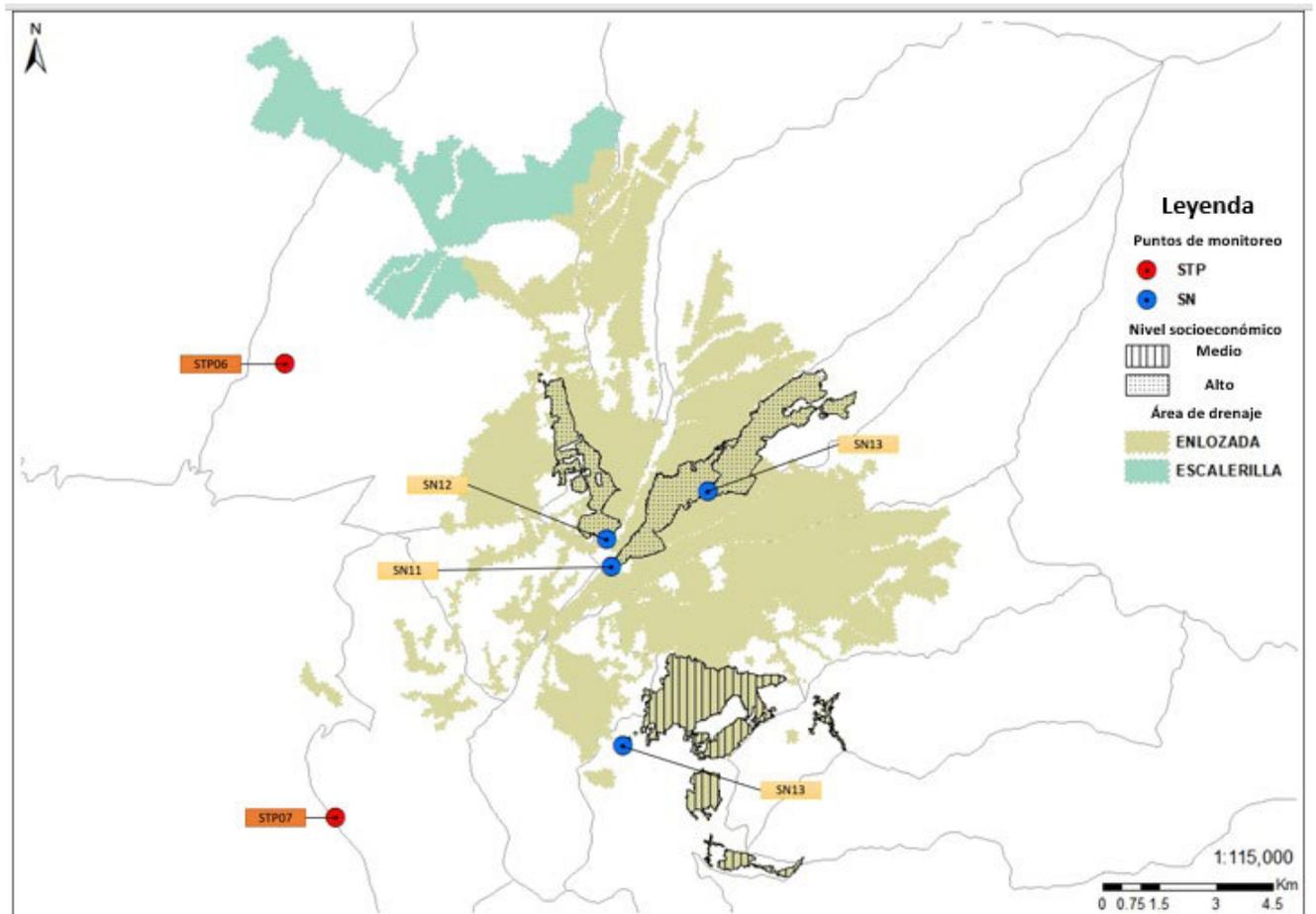


Figura 8. Mapa de las regiones monitoreadas y la ubicación de los puntos de muestreo en la ciudad de Arequipa que muestra el nivel de ingresos económicos de las poblaciones contribuyentes. STP: Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR); SN: Buzones de la red de alcantarillado (Col). (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022)

Tabla 1. Descripción general del monitoreo en aguas residuales para las ciudades de Lima, Callao y Arequipa. Las coordenadas UTM corresponden a los puntos de monitoreo. (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022)

Nombre	Coordenadas UTM	Buzón (1)	Población contribuyente al área de drenaje	Tiempo de monitoreo (hrs) (2)
PTAR Taboada	267931 (X); 8673107 (Y)	NA	4.288.450,00	24
PTAR La Chira	279167 (X); 8649657 (Y)	NA	1.852.682,00	24
PTAR Puente Piedra	271206 (X); 8677741 (Y)	NA	401.943,00	4
PTAR San Juan	285707 (X); 8652744 (Y)	NA	337.368,00	24
PTAR Ventanilla	266421 (X); 8687679 (Y)	NA	275.592,00	4
PTAR La Escalerilla	219187 (X); 8188684 (Y)	NA	81.689,00	24
PTAR La Enlozada	220491 (X); 8176654 (Y)	NA	766.043,00	24
Colector Canto Grande	280938 (X); 8669332 (Y)	BZ-264976	695.164,00	4
Colector Comas	269810 (X); 8673885 (Y)	BZ-346543	836.660,00	4
Colector Isabel La Católica	279798 (X); 8664950 (Y)	BZ-108938	357.534,00	4
Colector Villa María	286179 (X); 8655354 (Y)	BZ-87962	259.589,00	4
Colector Costanero	275529 (X); 8661486 (Y)	BZ-118311	125.379,00	4
Colector La Marina	275270 (X); 8663220 (Y)	BZ-118746	169.469,00	4
Colector La Molina	287232 (X); 8664167 (Y)	BZ-166706	46.174,00	4
Colector Chosica	301720 (X); 8673879 (Y)	BZ-187126	47.360,00	4
Colector Nuevo Centenario	268283 (X); 8669550 (Y)	BZ-233185	260.932,00	4
Colector 83	230373 (X); 8185305 (Y)	BZ-48148	43.702,00	4
Colector 56	227806 (X); 8183314 (Y)	BZ-49336	21.361,00	4
Colector Arrayanes	227687 (X); 8184041 (Y)	BZ-47207	31.118,00	4
Colector 73	228125 (X); 8178539 (Y)	BZ-48635	63.927,00	4

(1) Buzón de la red de alcantarillado (desagüe): Son estructuras que sirven como cámaras ubicadas en obras de saneamiento y desagüe. Su función principal es la de recolectar ramales segmentados dentro de una zona previamente delimitada para reestructurar y abastecer los servicios básicos de agua.

(2) Tiempo de monitoreo: Rango de horas en la que se realizó la toma de muestras (1 toma de muestra por hora). Cuanto la toma fue automatizada se pudo realizar el muestro en un día completo, mientras que en los casos que la toma fue manual se trabajó en un rango de 4 horas (se priorizó en dicho caso se realice durante las mañanas cuando hay un mayor uso de los baños por la población).

NA: No aplica

4.3 Del segundo artículo del proyecto “Desarrollo de una herramienta de alerta temprana a partir del monitoreo de aguas residuales desde el sector saneamiento”, el cual se tituló: “Evaluación de métodos de bajo costo de purificación de SARS-CoV-2 para la cuantificación viral y análisis NGS: Implicancias para la adopción de una epidemiología basada en aguas residuales más amplia”, se manejaron los siguientes procedimientos para el desarrollo de la tesis, según se extrae del mencionado documento para la misma:

4.3.1 Muestreo de las aguas residuales

Las muestras de aguas residuales utilizadas en este estudio se obtuvieron de pozos de registro de plantas de tratamiento de alcantarillado (PTARs) y de redes de alcantarillado (colectores) ubicados estratégicamente en 3 áreas urbanas importantes de Perú. En total, se utilizaron en el estudio 137 muestras de aguas residuales sin tratar, 49 de PTARs y 88 de colectores, recolectadas entre mayo de 2021 y octubre de 2021. La información detallada sobre cada muestra utilizada en el estudio se presenta en la Tabla 2. En todos los casos, se usaron muestras compuestas de 1 L recolectadas durante períodos de 24 h o 4 h (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022). Las muestras se mantuvieron refrigeradas, por debajo de 8 °C, en todo momento durante el muestreo y el transporte al laboratorio. Todas las muestras se procesaron dentro de las 48 h desde su recolección. La contribución pluvial a las muestras de aguas residuales fue insignificante (SENAMHI, 2021 a,b,c). El pH, la conductividad y la temperatura de la muestra compuesta se midieron en el sitio utilizando un multiparámetro pH/EC EZDO-7200 (GOnDO Electronic Co., Taipei, Taiwan). La Demanda Química de Oxígeno (DQO) fue determinada en todas las muestras por un laboratorio analítico comercial acreditado ISO 17025.

4.3.2 Concentración de partículas virales

Las partículas virales de SARS-CoV-2 se concentraron utilizando el método de adsorción-elución en una membrana electronegativa informado anteriormente (Ahmed *et al.*, 2020c; Katayama *et al.*, 2002; Symonds *et al.*, 2014). Se probaron cuatro enfoques de precondicionamiento de muestras: (1) adición de MgCl₂ (Himedia, Mumbai, India) hasta alcanzar una concentración final de 25 mM; (2) ajuste del pH de la muestra a 4 usando ácido acético (1M, pH entre 3-3.5) y se verificó que se alcance el pH=4 usando tiras reactivas de pH; (3) ajuste del pH de la muestra a 4 y adición de MgCl₂ (concentración final de 25 mM); y (4) sin aditivos. Se usaron cinco muestras compuestas independientes (Ver Tabla 2.1), de las cuales se tomaron dos alícuotas de 50 mL para cada tratamiento; haciendo un total de 10 muestras ensayadas por tratamiento. Se añadieron 100 µL de Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV; *Bovilis Vista Once SQ, MSD Animal Health, Nueva Jersey, EE. UU.*) a todas las muestras, como control de recuperación, y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente antes de la filtración. Todas las demás muestras del estudio (es decir, no utilizadas para probar el efecto del precondicionamiento de muestras en la recuperación viral) se precondicionaron añadiendo MgCl₂ (concentración final de 25 mM) (Ahmed *et al.*, 2020c). Las muestras se filtraron al vacío a través de una membrana electronegativa de ésteres de celulosa mixta (MCE) de 0,45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EE. UU.) para la retención de las partículas virales de interés. Las membranas que contenían el filtrado se colocaron dentro de tubos de perlas de cerámica de 2 mL (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Según el procedimiento de extracción de ARN a seguir, las membranas se sumergieron en 770 µL de RST1 con 230 µL de tampón Nucleozol del kit de aislamiento *NucleoSpin RNA Stool* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) o 1 mL de TRIzol (Ambion, Austin, Texas, EE. UU.) modificado. Se cortaron con tijeras esterilizadas en horno y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

4.3.3 Purificación de ARN Total

De forma predeterminada, el ARN total se obtuvo de muestras de aguas residuales filtradas utilizando el kit de aislamiento de *NucleoSpin® RNA Stool* siguiendo las instrucciones del fabricante, con modificaciones menores (ver Pardo-Figueroa *et al.*, 2022). Por ejemplo, para mejorar la recuperación de ARN, las membranas se sumergieron en 1 mL en lugar de 860 μ L (660 μ L RST1 y 200 μ L de tampones Nucleozol) y el volumen de los reactivos utilizados en los pasos posteriores se ajustó para mantener las proporciones constantes (ver Pardo-Figueroa *et al.*, 2022). El ARN total de 24 muestras seleccionadas (Ver Tabla 2.2) también se obtuvo usando el método de TRIzol (TRIzol®), que desde ahora se denominará TRIzol modificado, con los siguientes ajustes: 250 μ L de isopropanol y 250 μ L de una solución de precipitación con alto contenido de sal (citrato de sodio 0,8 M y NaCl 1,2 M), se agregó por 1 mL de Reactivo TRI a la fase acuosa para su separación, y luego se procedió a la precipitación del sedimento y al lavado del mismo con etanol (Chomzynski & Mackey, 1995). El ARN total obtenido bajo este procedimiento se eluyó finalmente en agua ultrapura libre de ARNasa-ADNasa (Ambion, Austin, Texas, EE. UU.) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento. El ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop One (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) a una longitud de onda de A260/A280 y A260/A230.

4.3.4 Cuantificación de ARN vía RT-qPCR

El procedimiento seguido para estimar la concentración de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales se describió previamente (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron por triplicado para todas las muestras y controles. Los controles positivos fueron (1) un plásmido comercial que contenía el gen N del SARS-CoV-2 (2019-nCoV_N_Positive Control, IDT, Newark, NJ, EE. UU.) y (2) un plásmido comercial que contenía la

subunidad p30 de la proteína ribonucleasa P del *Homo sapiens* (gen Hs_RPP30) (2019-nCoV RUO Kit (IDT)). De forma predeterminada, las curvas estándar se realizaron utilizando el plásmido 2019-nCoV_N_Positive Control con 10^1 a 10^4 copias del genoma por reacción.

Se probó la presencia de inhibidores de RT-qPCR para todas las muestras en el estudio mediante el ensayo de picos Sketa22, como se informó en Pardo-Figueroa et al., 2022 (basado en Haugland et al., 2005 y Ahmed et al., 2015). De manera similar, se determinó la recuperación de BRSV para todas las muestras en el estudio como se describe en Pardo-Figueroa et al., 2022 (basado en Haugland et al., 2005). El Límite de Detección (LOD) se determinó en 22 copias del genoma por reacción (8.8 copias/mL de aguas residuales) (Pardo-Figueroa et al., 2022), usando un modelo exponencial (Verbyla et al., 2016) con 95% probabilidad de amplificación (Mota et al., 2021).

4.3.5 Detección de variantes de SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales

Para comparar aún más los métodos de extracción de ARN de muestras de aguas residuales, los genomas del SARS-CoV-2 se secuenciaron mediante el ensayo COVIDSeq (Illumina, San Diego, California, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para enriquecer el ARN del SARS-CoV-2, se utilizaron un grupo de cebadores ARTIC v4 (Illumina) y todos los reactivos contenidos en el kit COVIDSeq. las muestras indexadas se secuenciaron en una máquina MiniSeq con un kit MiniSeq System Mid-Output (2x149 ciclos). Las lecturas sin procesar de muestras de aguas residuales se sometieron a control de calidad con Trimmomatic 0.39 (Bolger et al., 2014), luego se mapearon al genoma de referencia del SARS-CoV-2 (NC_045512) con samtools (Danecek et al., 2021). La identificación del linaje del SARS-CoV-2 se llevó a cabo con la canalización VLQ (Cuantificación de linaje viral), (Baaijens et al., 2021, https://github.com/baymlab/wastewater_analysis) usando lecturas

recortadas del paso anterior y parámetros predeterminados. Se utilizó como base de datos de referencia todas las muestras de genoma clínico reportadas para Perú en GISAID durante el 2021 (8474 genomas correspondientes a 100 linajes).

4.3.6 Análisis estadístico

Para probar el efecto del acondicionamiento de la muestra antes de la filtración en la recuperación de BRSV y SARS-CoV-2, se compararon (1) las concentraciones de ARN entre todos los tratamientos usando el modelo factorial de Transformación de Rango Alineado (ART, de sus siglas en inglés, *Aligned Rank Transform*) (la hipótesis nula es que todas las medias son iguales; con un 95% de confianza) y (2) la prueba estadística pareada unilateral de Wilcoxon (Marusteri & Bacarea, 2010) (la hipótesis nula es que el tratamiento 2 es igual al tratamiento 1, el tratamiento 3 y el tratamiento 4, probados de forma independiente; con un 95% de confianza). El modelo factorial de Transformación de Rango Alineado es una aproximación no paramétrica al factorial ANOVA que permite analizar posibles interacciones y efectos principales en la presencia de mediciones repetidas. La prueba estadística pareada unilateral de Wilcoxon es también una prueba no paramétrica y tampoco asume independencia entre de sus réplicas, tratándolas como mediciones repetidas. La recuperación de BRSV y SARS-CoV-2 cumple estas condiciones porque el número de muestras independientes es 5 con 2 réplicas experimentales (submuestras tomadas de la misma botella) y 3 o 2 réplicas técnicas (Réplicas de reacción de RT-qPCR) de SARS-CoV-2 y BRSV respectivamente y las condiciones de los aditivos no influyeron entre sí.

Para probar el efecto de los métodos de extracción de ARN en la estimación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, se utilizó la prueba t pareada de medias de 21 muestras, correspondientes a 21 muestras independientes con 3 réplicas técnicas cada una ($n = 21$; 95% de confianza).

Finalmente, para probar el efecto de los parámetros fisicoquímicos dentro de la muestra en la recuperación viral, primero se evaluó si los datos de las concentraciones de ARN de SARS-CoV-2 seguían una distribución normal usando el diagrama de Cullen y Frey (Cullen y Frey, 1999) y el estadístico Shapiro Wilk. test, con un 95% de confianza (Royston, 1982). Luego se realizó una regresión lineal múltiple entre la concentración de ARN de SARS-CoV-2 con pH, temperatura, conductividad eléctrica y DQO (n = 123 por parámetro) (Becker *et al.*, 1988). Todas las pruebas estadísticas y análisis de datos se realizaron en R versión 4.1.2., utilizando RStudio como front-end. (Allaire, J. 2012).

5. Resultados y Discusión:

5.1 Efecto del acondicionamiento previo a la filtración de muestras de aguas residuales en la recuperación de partículas virales

Se evaluó el efecto del acondicionamiento de la muestra antes de la filtración en (1) la recuperación de ARN de SARS-CoV-2 (Figura 9) y (2) la recuperación de ARN de BRSV (Figura 10). Se midió la concentración de cualquiera de los genomas virales mediante RT-qPCR y se buscó diferencias estadísticamente significativas de las medias de las concentraciones de ARN (i) entre todos los tratamientos y (ii) entre el tratamiento 2 (que contó con la adición de $MgCl_2$ a una concentración final de 25 mM) frente a todos los demás tratamientos. Anteriormente se informó que el tratamiento 2 produjo la máxima recuperación ($65,7 \pm 23,8$ %) del virus de la hepatitis murina (MHV) en muestras de aguas residuales (Ahmed *et al.*, 2020b). Se decidió hacer una comparación relativa en lugar de absoluta (es decir, estimar el porcentaje de recuperación) para probar entre tratamientos debido a los diferentes rendimientos de extracción que pueden ocurrir para BRSV entre matrices (es decir, buffer versus aguas residuales), como lo sugiere (Kantor *et al.*, 2021) y porque no se disponía de partículas virales de SARS-CoV-2 purificadas. En todos los casos, el ARN total se obtuvo mediante el kit *NucleoSpin RNA Stool* y se estimó mediante RT-qPCR. Se construyeron diagramas de caja con 30 puntos de datos correspondientes a 10 muestras independientes con 3 estimaciones de RT-qPCR cada una. Se construyeron diagramas de caja con 20 puntos de datos correspondientes a 10 muestras independientes con 2 estimaciones de RT-qPCR cada una. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una prueba ART (para comparar todas las medias de los tratamientos) y la prueba estadística pareada de Wilcoxon unilateral (para comparar el tratamiento 2 con todos los demás), con un 95 % de confianza.

Al evaluar la recuperación de SARS-CoV-2, no se encontró evidencia estadística para rechazar que todos los tratamientos son iguales (p -valor= 0.01213). La prueba de Transformación de Rango Alineado (ART) alinea

los tratamientos con sus réplicas experimentales y desarrolla comparaciones apareadas entre todos los tratamientos y sus interacciones. Al contrastar todos los tratamientos juntos, la prueba rechaza la hipótesis nula que todos los tratamientos son iguales (p-valor= 0.003). Luego al contrastar los tratamientos por pares, el modelo sólo rechaza que el Tratamiento 2 sea igual al Tratamiento 3 (p-valor=0.0019). De igual forma, al contrastar los tratamientos y sus réplicas experimentales correspondientes, el modelo sólo puede rechazar que el Tratamiento 2- réplica experimental I sea igual a: (a) Tratamiento 1- réplica experimental II (p-valor= 0.0111), (b) Tratamiento 3- réplica experimental I (p-valor= 0.0141) y (c) Tratamiento 3- réplica experimental II (p-valor= 0.001) pero no otras comparaciones por pares. Esto puede indicar que el contraste entre los tratamientos solos puede ser engañoso debido a la involucración de interacciones entre los tratamientos y sus réplicas experimentales. Al comparar la recuperación de ARN de SARS-CoV-2 por pares usando la prueba de Wilcoxon, se encontró que el tratamiento 2 produjo una mayor recuperación que el tratamiento 1 (p-valor= 0,01147) y el tratamiento 3 (p-valor= 0,00147), de acuerdo con (Ahmed *et al.*, 2020b). Se ha señalado que la adición de sales puede permitir la formación de puentes iónicos positivos entre la superficie del virus con carga negativa y el filtro de nitrocelulosa con carga negativa, favoreciendo la recuperación (Ahmed *et al.*, 2020c; Cashdollar *et al.*, 2013; Haramoto *et al.*, 2009; Wallis *et al.*, 1967a; 1967b). Curiosamente, no se encontró evidencia estadística para rechazar que el tratamiento 2 produjo una recuperación de ARN de SARS-CoV-2 similar a la del control (p-valor= 0,8394 en la prueba de Wilcoxon, p-valor= 0.2862 en la prueba ART). Esto podría ser un artefacto introducido por 3 estimaciones atípicas de RT- qPCR (réplicas técnicas) de una de las 10 muestras evaluadas en el grupo de control, lo que introduce un sesgo en el análisis estadístico (Figuras 15 y 16). Alternativamente, esto puede explicarse por la presencia natural de varios iones en la matriz de las aguas residuales (Le Bonté *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2019) que pueden cumplir el papel de puentes salinos para la atracción de partículas virales a la membrana. Los resultados de la prueba de Wilcoxon pueden también

sugerir que al disminuir el pH de la muestra de agua residual puede impedir más que promover la adsorción del ARN de SARS-CoV-2 a la membrana cargada negativamente (Figura 9) Se sabe que los virus se adsorben a superficies cargadas negativamente en un pH por debajo de su punto isoeléctrico (Zerda *et al.*, 1985) El punto isoeléctrico de SARS-CoV-2 fue estimado entre 5.2-5.3 en sales 20mM (Areo *et al.*, 2021). En este estudio, se ajustó el pH usando ácido acético (1M, pH entre 3-3.5) y se verificó que se alcance el pH=4 usando tiras reactivas de pH. Este ajuste de pH sería suficiente para promover la adhesión de las partículas virales a la membrana electronegativa; sin embargo, no se puede descartar otros efectos de la matriz y/o de la integración de las partículas virales en la muestra de agua residual afectando esta interacción.

En el caso de BRSV, donde se agregó la misma cantidad de BRSV a todas las muestras de aguas residuales en todos los tratamientos de acondicionamiento, tampoco se encontró evidencia estadística para rechazar que todos los tratamientos son iguales. Al contrastar todos los tratamientos juntos, la prueba ART rechazó la hipótesis nula que todos los tratamientos sean iguales (p-valor=0.006). Luego al contrastar los tratamientos por pares, el modelo sólo rechazó que el Tratamiento 2 sea igual al Tratamiento 3 (p-valor=0.004). Sin embargo, al contrastar los tratamientos con sus réplicas experimentales correspondientes, el modelo sólo pudo rechazar que el Tratamiento 2- réplica experimental I sea igual al Tratamiento 3- réplica experimental I (p-valor= 0.045), más no otra comparación por pares. Al comparar el Tratamiento 2 contra todos los demás tratamientos usando la prueba de Wilcoxon, el resultado no siguió la misma tendencia que para el SARS-CoV-2 (Figura 9): El Tratamiento 2 alcanzó una menor recuperación que el Tratamiento 1 (p-valor=0.048) y el Tratamiento 3 (p-valor=0.001). Parece ser que el efecto del pH ácido pueda tener un efecto más dramático al capturar las partículas virales (posiblemente cargando la superficie de la membrana) (Ahmed *et al.*, 2015; Sabatino *et al.*, 1980), que pueden haber estado más expuestas (es decir, menos integrada con la matriz de aguas residuales) o más intactas. Curiosamente, no se encontró evidencia estadística para rechazar que el Tratamiento 2 sea igual al grupo de control (p-valor= 0.066, en la prueba de

Wilcoxon, p =valor 0.501 en la prueba ART), como fue el caso cuando se probó la recuperación del ARN de SARS-CoV-2, lo que respalda aún más la idea de que los iones presentes en la muestra de aguas residuales sirven como puentes salinos para ayudar a la unión. (Wallis y col., 1967b). En cualquier caso, el hecho de que los resultados con cualquiera de los sistemas virales fueran diferentes podría deberse a (i) la naturaleza similar (es decir, ambos son virus con envoltura de ARN; Larsen et al., 2000) pero diferente de cada virus, o (ii) el hecho de que al agregarse el BSRV exógenamente a la muestra de aguas residuales poco antes de la filtración, no permitiese un grado similar de integración con la matriz de aguas residuales, al margen que también mantuviese una mayor integridad. En cualquier caso, estos resultados sugieren que los virus sustitutos deben ser considerados cuidadosamente al evaluar la recuperación de un objetivo viral determinado (Twigg & Wenk, 2022).

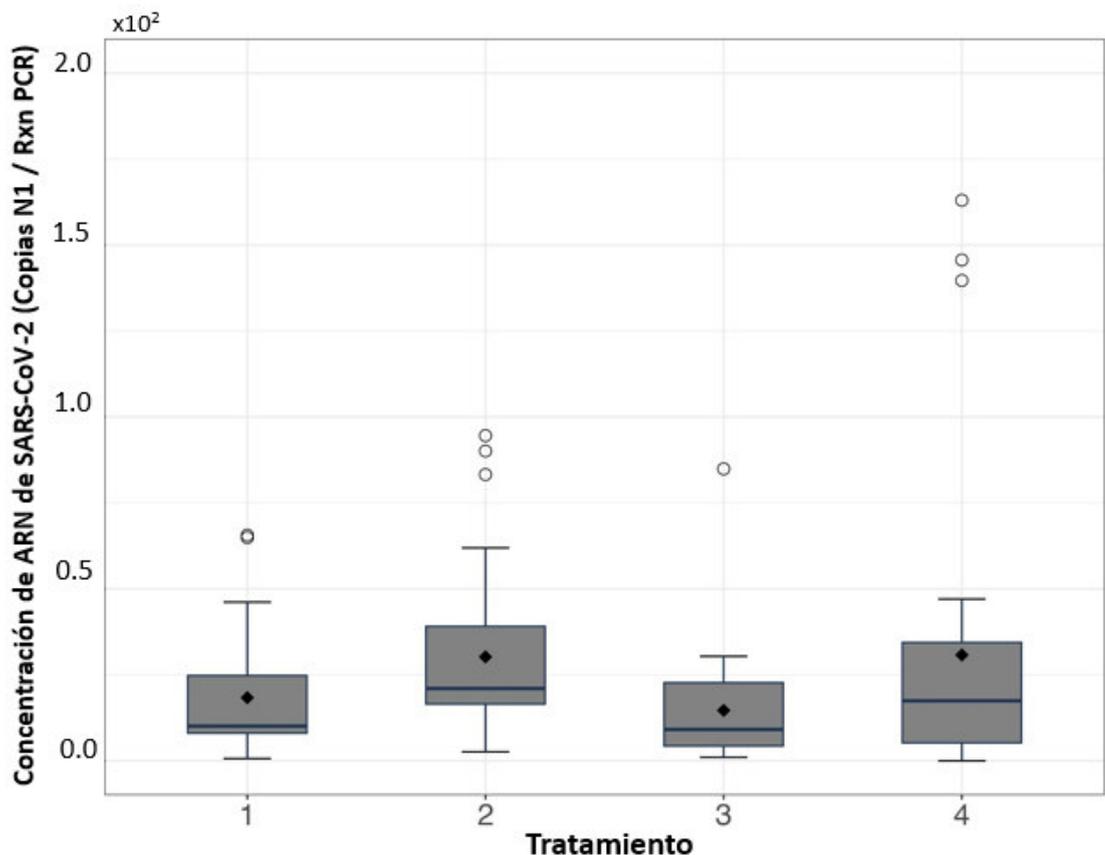


Figura 9. Efecto del acondicionamiento de la muestra antes de la filtración en la recuperación de ARN de SARS-CoV-2. Se muestran la mediana (—), la media (◆) y los valores atípicos (○). (Reyes *et al.*, 2023)

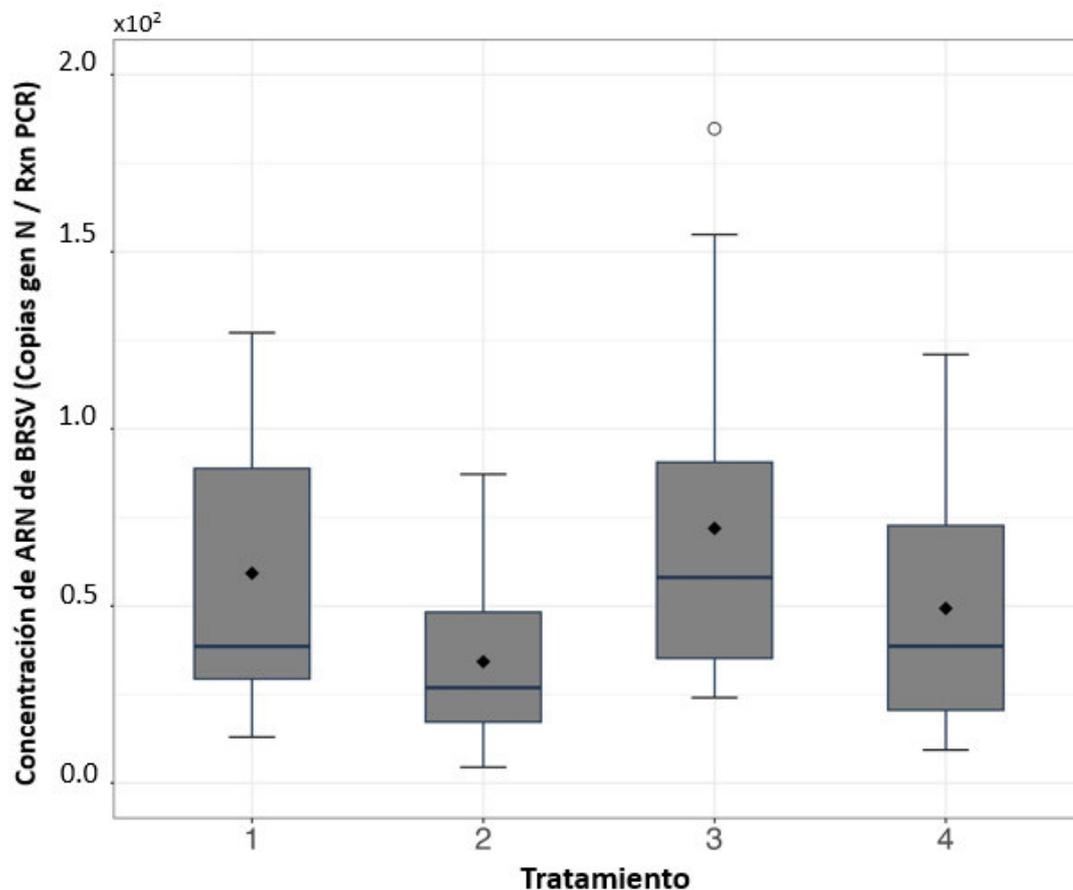


Figura 10. Efecto del acondicionamiento de la muestra antes de la filtración en la recuperación viral del Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV). Se muestran la mediana (–), la media (♦) y los valores atípicos (○). (Reyes et al., 2023)

5.2 Efecto de los parámetros fisicoquímicos en las aguas residuales en la recuperación viral

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple utilizando 123 muestras con distribución espacial y temporal (Ver Tabla 2.3) para identificar si el pH, la temperatura, la conductividad y la demanda de oxígeno en las muestras de aguas residuales pueden tener un efecto en la recuperación del SARS-CoV-2. Primero, se evaluó si los datos de concentración de SARS-CoV-2 seguían una distribución normal utilizando el diagrama de Cullen y Frey. Como se puede ver en la Figura 11, ni los datos obtenidos ni ninguna de sus submuestras arrancadas son consistentes con la distribución normal. Luego se realizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk, rechazando la hipótesis nula de normalidad. En consecuencia, se realizó una regresión

lineal múltiple utilizando la correlación de Spearman (para datos que no siguen una distribución normal) entre pH, temperatura (T), conductividad iónica (C), demanda química de oxígeno (DQO) en aguas residuales y concentración de SARS-CoV-2. Como se puede ver en la Figura 12, En ambos casos $n = 123$. los resultados obtenidos sugieren que la temperatura tiene una correlación negativa significativa ($R = -0,25$) con la concentración de SARS-CoV-2. El pH, la conductividad y la DQO de la muestra no tuvieron un efecto significativo en la recuperación del SARS-CoV-2 de las muestras de aguas residuales. Es importante tener en cuenta que los parámetros fisicoquímicos solo pueden afectar la recuperación viral por filtración, ya que todos los demás pasos ocurren en soluciones buffer estándar. El rango de variación de todos los parámetros se presenta en la Tabla 3. En el caso del pH, la variación osciló entre 6,3 y 8,7 con una mediana de 7,4, que no es lo suficientemente amplia como para generar un efecto significativo en la recuperación. Los coeficientes de variación de la conductividad iónica y la DQO fueron de 0,27 y 0,47, que también podrían ser demasiado estrechos para afectar la recuperación. Solo una variación de temperatura de 13,7 °C a 19,1 °C tuvo un impacto significativo en la recuperación, posiblemente relacionado con la persistencia viral y del ARN. Schussman también informó sobre el efecto de una temperatura más alta que reduce las concentraciones de ARN de SARS-CoV-2 en las aguas residuales municipales, quien también notó efectos insignificantes de la demanda de oxígeno y los sólidos suspendidos en la concentración de ARN de SARS-CoV-2 (Schussman *et al.*, 2022). Por lo tanto, estos resultados respaldan aún más la necesidad de tener en cuenta las variaciones estacionales en el monitoreo de objetivos virales en aguas residuales, incluso en zonas tropicales.

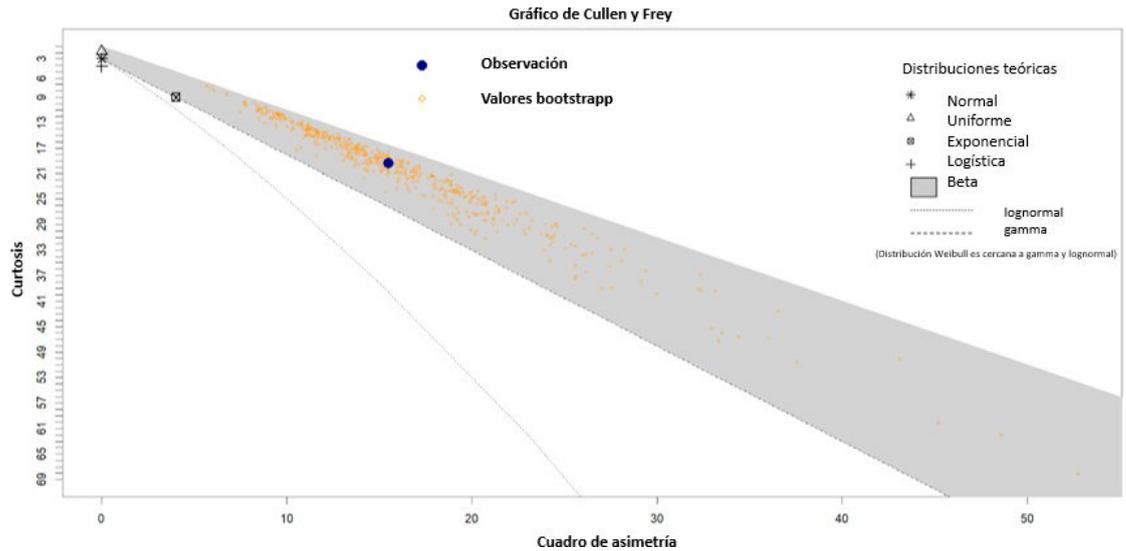


Figura 11. Efecto de parámetros fisicoquímicos en muestras de aguas residuales en la recuperación de ARN de SARS-CoV-2. (Reyes *et al.*, 2023)

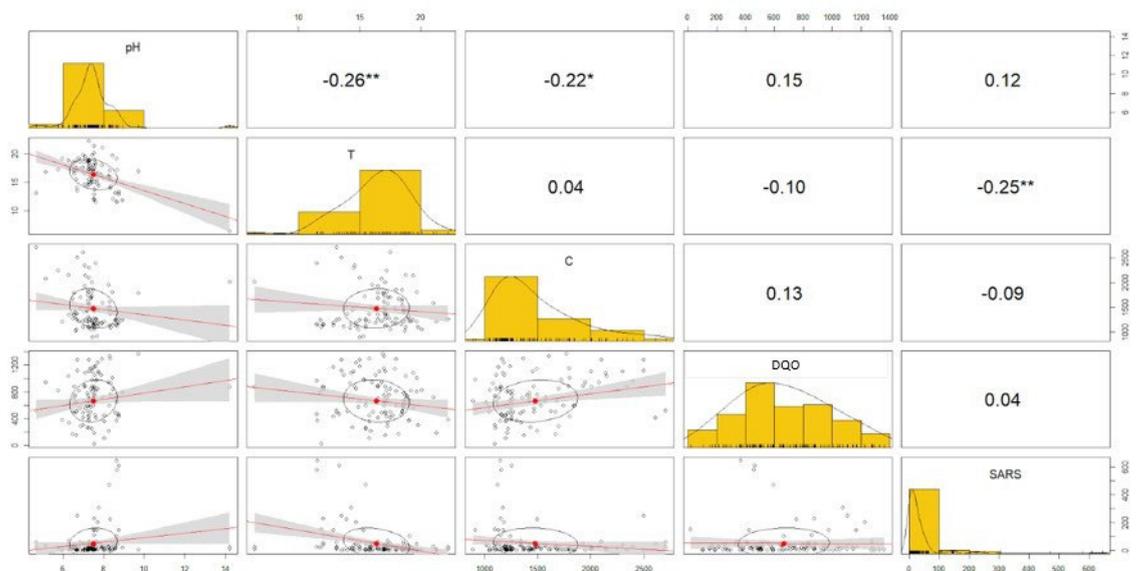


Figura 12. Efecto de parámetros fisicoquímicos en muestras de aguas residuales en la recuperación de ARN de SARS-CoV-2. Los asteriscos (*) indican que el coeficiente de correlación es estadísticamente significativo. (Reyes *et al.*, 2023)

5.3 Efecto del método de extracción del ARN de la región N1 del gen N de SARS-CoV-2 en la cuantificación por RT-qPCR

Se purificó el ARN total de 24 muestras de aguas residuales con una amplia distribución espacial y temporal (Ver Tabla 2.2) utilizando (1) un kit basado en columnas (*NucleoSpin RNA Stool*) y (2) un método basado en precipitación (TRIZOL modificado), para estimar las copias del ARN de la región N1 del gen N de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Solo se utilizaron en el análisis 21 muestras, que tenían una concentración de ARN de la región N1 del gen N de SARS-CoV-2 superior al límite de detección (LOD). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de ARN de la región N1 del gen N de SARS-CoV-2 estimada para la misma muestra cuando se obtuvo con cualquiera de los métodos de purificación de ARN (Figura 13; p-valor= 0,8994). Se construyeron diagramas de caja con 63 puntos de datos: 21 muestras independientes por tratamiento con 3 estimaciones de RT-qPCR cada una. Las proporciones de absorbancia de las soluciones de ARN fueron relativamente similares, lo que indica niveles de pureza comparables (Thermo Scientific, consultado en 2022): para el *kit NucleoSpin RNA Stool*, variaron de 2,06 a 2,16 (A260/A280) y de 1,83 a 2,46 (A260/A230), y para el método de TRIZOL modificado oscilaron entre 1,97 y 2,17 (A260/A280) y entre 1,57 y 2,45 (A260/A230).

El *kit NucleoSpin RNA Stool* está diseñado para muestras fecales y se ha utilizado con éxito para analizar muestras de aguas residuales, que contienen muchos inhibidores de PCR (Giraud-Billoud *et al.*, 2021; Schang *et al.*, 2021; Pardo-Figueroa *et al.*, 2022). El método TRIZOL es un método de extracción de ARN muy conocido que también se ha utilizado para el análisis de aguas residuales (Trujillo *et al.*, 2021). El costo de una preparación de ARN usando *NucleoSpin RNA Stool* (aprox. \$15/prep) fue 5 veces más alto que el de usar el método TRIZOL modificado (aprox. \$3/prep). Inicialmente probamos un procedimiento de extracción de ARN TRIZOL estándar, pero arrojó resultados deficientes en comparación con el método basado en columnas (datos no mostrados). Luego, se incluyó un paso adicional de purificación de sal en el procedimiento con TRIZOL y se obtuvieron resultados comparables con el enfoque basado en columnas. Sin embargo,

se observó una mayor variabilidad en la cuantificación de ARN de la región N1 del gen N de SARS-CoV-2 entre muestras para la purificación con TRIzol modificado (Figura 13), posiblemente debido al paso de extracción en fase acuosa, que exige una gran habilidad técnica. Además, dado que el kit *NucleoSpin RNA Stool* se basa en columnas de sílice, el ARN se puede recuperar de forma más reproducible que el método TRIzol modificado, que utiliza etanol para precipitar el ARN. Además, el enfoque basado en TRIzol modificado implica más pasos que el método *NucleoSpin*, lo que puede aumentar el riesgo de pérdida de ARN durante el procedimiento.

En cualquier caso, los resultados obtenidos indican que ambos métodos podrían usarse con éxito para cuantificar ARN viral en muestras de aguas residuales. El método del TRIzol modificado es más barato, pero toma más tiempo y requiere mayor habilidad técnica. El método basado en columnas es más costoso, pero produce resultados un poco más sólidos, es más rápido y requiere personal mínimamente capacitado.

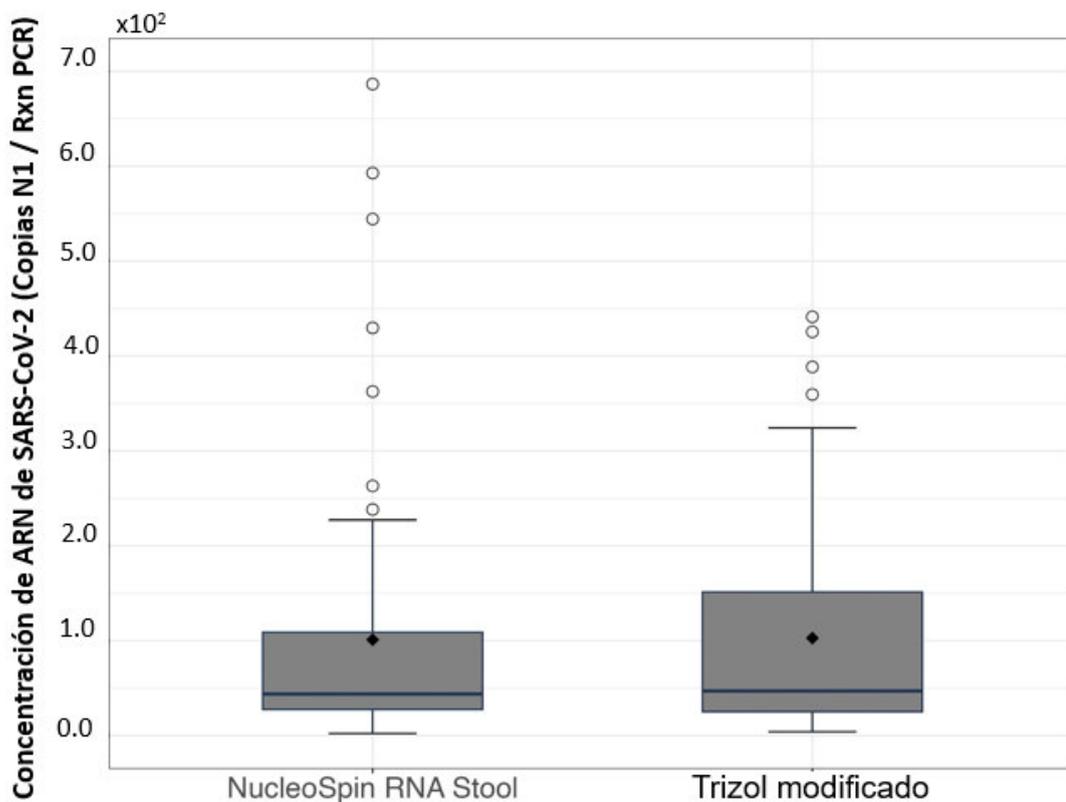


Figura 13. Efecto del método de purificación de ARN de muestras de aguas residuales en la cuantificación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Se muestran la mediana (—), la media (◆) y los valores atípicos (○). (Reyes *et al*, 2023)

5.4 Identificación de linajes de SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales

Se generaron lecturas pareadas para 24 muestras de ARN purificadas mediante el método con TRIzol modificado o el kit *NucleoSpin RNA Stool*. Las muestras se numeraron del 1 al 24 y se procesaron con ambos métodos (es decir, "_Tr" significa muestras extraídas con TRIzol modificado y "_Ns", para las de NucleoSpin). Solo cuatro muestras (18_Ns, 20_Ns, 21_Ns, 3_Tr) produjeron menos de 50 000 lecturas pareadas después de la secuenciación de Illumina (Ver Tabla 4). Después del control de calidad y el recorte, todas las muestras mostraron más de 50 000 lecturas pareadas excepto las mismas cuatro muestras mencionadas anteriormente. En particular, después del paso de mapeo, se mapearon muy pocas o ninguna lectura al genoma de referencia para las muestras de NucleoSpin 4_Ns, 12_Ns, 13_Ns, 16_Ns, 17_Ns, 18_Ns, 19_Ns, 20_Ns, 21_Ns, 22_Ns, 23_Ns, 24_Ns. Al comparar los datos de calidad de las muestras de NucleoSpin y TRIzol modificado, se encontró un mayor rendimiento y una salida de lectura total de las muestras de TRIzol modificado, así como un total de lecturas mapeadas con el genoma de referencia del SARS-CoV-2 (Figura 14). En ese sentido, el método del TRIzol modificado obtuvo mejores resultados en el análisis NGS para SARS-CoV-2 que el enfoque basado en columnas, posiblemente debido a que se recupera una gama más amplia de fragmentos de ARN mediante el enfoque de precipitación en contraste con la adsorción selectiva de fragmentos de ARN en la columna de sílice.

Fueron secuenciadas un total de 24 muestras de ARN para cada método de extracción y el total de reads fue expresado. Las barras de trimmed reads mostraron el porcentaje total de reads que presentaron una mayor calidad después del filtrado Trimmomatic. Las barras de GISAID-matched reads mostraron el porcentaje de reads totales que se alinearon con la base de datos de referencia de GISAID que se usó para el estudio.

Se construyó un mapa de calor (*heatmap*) usando el conteo de *GISAID-matched read*, en escala logarítmica. Los números y datos en la parte inferior corresponden a cada muestra analizada con ambos métodos y a sus

fechas de muestreo. Los linajes con baja detección (abundancia <5% de *GISAID-matched reads*) no fueron considerados en el mapa de calor. Las variantes *Alpha* (Linajes B.1.1.7 y Q), *Beta* (Linajes B.1.351 y sus descendientes), *Gamma* (Linajes P.1 y sus descendientes), *Delta* (Linajes B.1.617.2 y AY), *Lambda* (C.37, C.37.1) y *Mu* (B.1.621, B.1.621.1) son representadas en el gráfico (Figura 15).

Usando ARN de ambos métodos de extracción, fue posible la detección de variantes de SARS-CoV-2. En total, el método *NucleoSpin* detectó solo 24 variantes, mientras que TRIzol modificado detectó 41. Las variantes Delta y Gamma fueron las variantes de preocupación (VOC) más frecuentes en las muestras y Lambda fue la variante de interés (VOI) más frecuente (Figura 15). Además, se pueden observar indicios temporales de la presencia de linajes de SARS-CoV-2. Si bien las muestras recolectadas entre junio y julio de 2021 fueron claramente abundantes en variantes Lambda (C.37, C.37.1); en muestras de septiembre y octubre de 2021, dicha abundancia disminuyó drásticamente; en cambio, comenzó a aparecer Delta (AY y descendientes). Este resultado se correlaciona fuertemente con los datos clínicos (consulte https://nextstrain.org/community/quipupe/2021?c=pango_lineage).

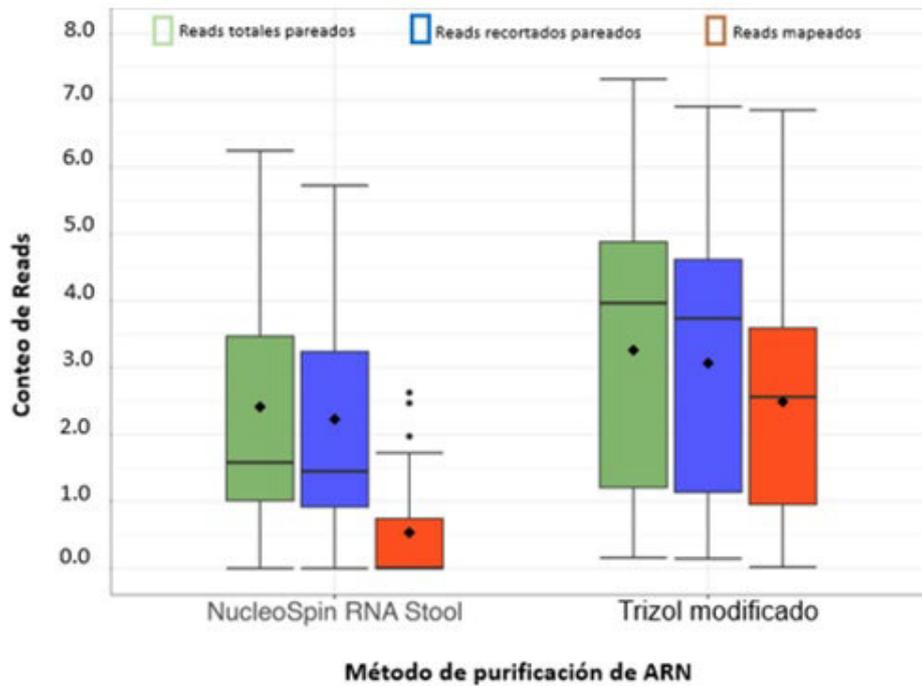


Figura 14. Efecto del método de extracción de ARN en la calidad de los *reads* del secuenciamiento NGS de SARS-CoV-2 en muestras de agua residual. (Reyes *et al.*, 2023)

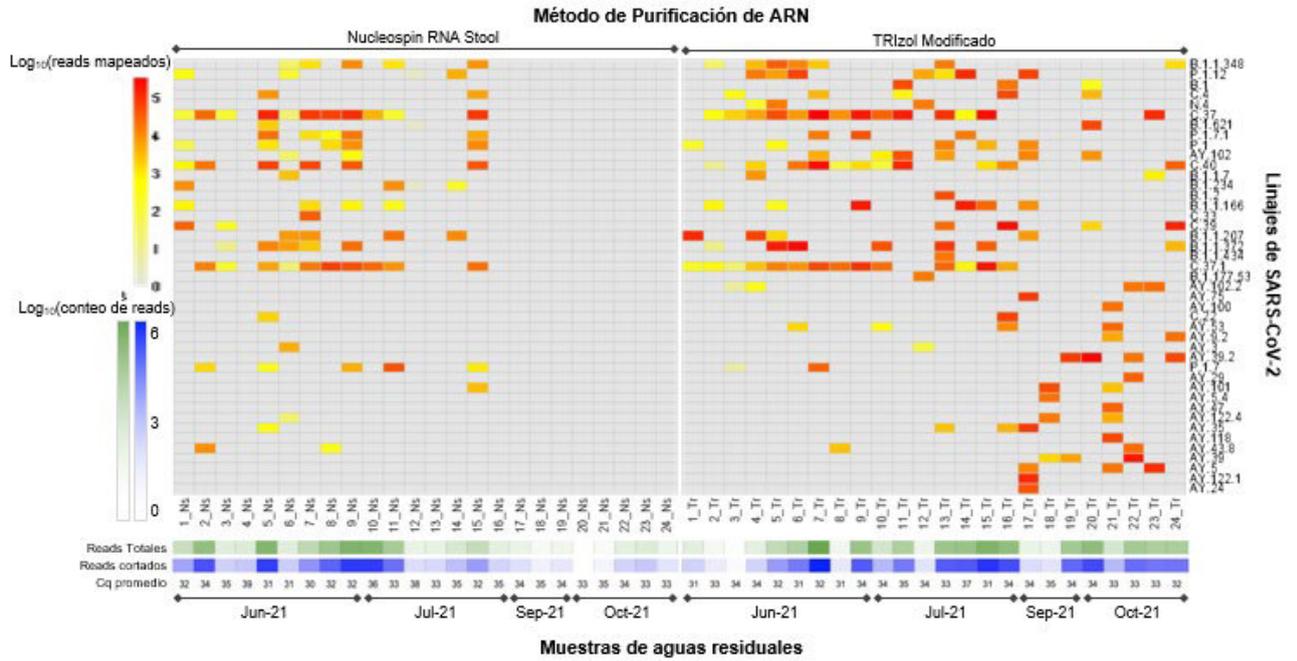


Figura 15. Detección de linajes de SARS-CoV-2 de muestras de ARN de agua residual aisladas con el kit *Nucleospin RNA Stool* y el método TRIZOL modificado. (Reyes *et al.*, 2023)

6. Conclusiones:

1. Este estudio demuestra la utilidad del análisis epidemiológico basado en aguas residuales (WBE) para controlar la vigilancia de la pandemia de COVID-19, especialmente en el contexto de datos clínicos extremadamente escasos. (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022)
2. La información proporcionada por el análisis de ARN del SARS-CoV-2 en aguas residuales demuestra ser confiable al seguir las mismas tendencias que los indicadores del sector salud durante las fechas que se entrecruzó la información de WBE. (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022)
3. La WBE ofrece una alternativa más económica ya que reduce abismalmente los costos de un tamizaje clínico a una población, siendo además sensible y teniendo un mayor alcance para anticiparse a la aparición de nuevas oleadas de contagio. (Pardo-Figueroa *et al.*, 2022)
4. Se muestra que es importante evaluar diferentes parámetros que pueden tener efecto en la recuperación de partículas virales de SARS-CoV-2 y posterior estimación por RT-qPCR. (Reyes *et al.*, 2023)
5. El ajuste y reducción del pH de la muestra y la adición de aditivos como el MgCl₂ en el presente estudio tiene un efecto insignificante en la recuperación viral debido a las sales ya presentes en la matriz de aguas residuales. (Reyes *et al.*, 2023)
6. Se valida que la temperatura, entre otros parámetros fisicoquímicos en la muestra de aguas residuales, puede afectar la estimación de las cargas virales, por lo que los esfuerzos de WBE deben tener en cuenta la variación estacional. (Reyes *et al.*, 2023)
7. Se demuestra que el método del TRIzol modificado posee resultados comparables aun método basado en columnas como el *Nucleospin RNA Stool*, aunque si tiene exigencias por ser laborioso y requerir mayor habilidad técnica. (Reyes *et al.*, 2023)
8. Se demuestra que el método del TRIzol modificado tiene mejores resultados en el análisis NGS para SARS-CoV-2 que el enfoque

basado en columnas. Esto posiblemente se deba a que se recupera una gama más amplia de fragmentos de ARN mediante el enfoque de precipitación en contraste con la adsorción selectiva de fragmentos de ARN en la columna de sílice. Este hallazgo deberá confirmarse aún más con otros objetivos virales, especialmente para muestras de aguas residuales donde la integridad de los genomas virales puede verse comprometida. (Reyes *et al.*, 2023)

9. Se consolida en esta investigación la WBE como una estrategia para cuantificar el virus SARS-CoV-2 y la NGS para poder identificar sus variantes en muestras de agua residual previamente purificadas en el laboratorio. (Reyes *et al.*, 2023)

7. Recomendaciones

- 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. Prestar atención a las variaciones en la carga viral detectada durante los monitoreos, considerando la data del sector salud y cualquier discrepancia tomar las medidas de atención en todas las etapas del proceso, tanto obtención de muestra (cadena de frío, limpieza adecuada de recipientes), filtración, extracción de ARN y amplificación, ya que siempre es importante la evaluación continua y a conciencia de los analistas para el control de calidad de las operaciones en campo y laboratorio de WBE.
- En el laboratorio 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. 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. Esto principalmente a la gran cantidad de inhibidores presentes en las muestras de agua residual y amplicones que pueden contaminar y generar corridas de PCR inválidas.
- El límite de detección de la prueba debe ser establecido por cada laboratorio teniendo en cuenta todas las variables involucradas, como en el caso de la qPCR llevada a cabo en el presente estudio.
- El hallazgo que el método con TRIzol modificado tiene mejores resultados en el análisis NGS para SARS-CoV-2 que el enfoque basado en columnas deberá confirmarse aún más con otros objetivos virales, especialmente para muestras de aguas residuales donde la integridad de los genomas virales puede verse comprometida.
- Se considera relevante evaluar dos enfoques de extracción de ARN diferentes para la identificación de variantes virales por NGS

8. Referencias bibliográficas

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), e00025-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00025-18>

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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2042–2049. <https://doi.org/10.1128/aem.03851-14>

Ahmed, W.; Angel, N.; Edson, J.; Bibby, K.; Bivins, A.; O'Brien, J. W.; Choi, P. M.; Kitajima, M.; Simpson, S. L.; Li, J.; Tscharke, B.; Verhagen, R.; Smith, W.; Zaugg, J.; Dierens, L.; Hugenholtz, P.; Thomas, K. V.; Mueller, J. F. (2020a). *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*. *The Science of the total environment*, 728, 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>

Ahmed, W.; Bertsch, P. M.; Angel, N.; Bibby, K.; Bivins, A.; Dierens, L.; Edson, J.; Ehret, J.; Gyawali, P.; Hamilton, K. A.; Hosegood, I.; Hugenholtz, P.; Jiang, G.; Kitajima, M.; Sichani, H. T.; Shi, J.; Shimko, K. M.; Simpson, S. L.; Smith, W.; Symonds, E. M.; ... Mueller, J. F. (2020b). *Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers*. *Journal of travel medicine*, 27(5), taaa116. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa116>

Ahmed, W.; Bivins, A.; Bertsch, P. M.; Bibby, K.; Choi, P. M.; Farkas, K.; Gyawali, P.; Hamilton, K. A.; Haramoto, E.; Kitajima, M.; Simpson, S. L.; Tandukar, S., Thomas, K.; Mueller, J. F. (2020c). *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*, 10.1016/j.coesh.2020.09.003. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.09.003>

Allaire, J. (2012). *RStudio: integrated development environment for R*. Boston, MA 770, 165–171.

Areo, O., Joshi, P. U., Obrenovich, M., Tayahi, M., & Heldt, C. L. (2021). Single-Particle Characterization of SARS-CoV-2 Isoelectric Point and Comparison to Variants of Interest. *Microorganisms*, 9(8), 1606. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081606>

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. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu384>

Baaijens, J.A.; Zulli, A.; Ott, I.M.; Petrone, M.E.; Alpert, T.; Fauver, J.R.; Kalinich, C.C.; Vogels, C.B.F.; Breban, M.I.; Duvallet, C.; McElroy, K.; Ghaeli, N.; Imakaev, M.; Mckenzie-Bennett, M.; Robison, K.; Plocik, A.; Schilling, R.; Pierson, M.; Littlefield, R.; Spencer, M.; Simen, B; Yale SARS-CoV-2 Genomic Surveillance Initiative; Hanage, W.P.; Grubaug, N.D; Peccia, J.; Baym, M. (2021). PREPRINT. *Variant abundance estimation for SARS-CoV-2 in wastewater using RNA-Seq quantification*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.08.31.21262938>

Barril, P. A.; Pianciola, L. A.; Mazzeo, M.; Ousset, M. J.; Jaureguiberry, M. V.; Alessandrello, M.; Sánchez, G.; Oteiza, J. M. (2020). *Evaluation Of Viral Concentration Methods For Sars-Cov-2 Recovery From Wastewaters*. *Science of The Total Environment*, 144105. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144105>

Becker, R.A.; Chambers, J.M.; Wilks, A.R. (1988). *The New S Language*. Wadsworth & Brooks/Cole. Comput. Sci. Ser. Pacific Grove, CA.

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), eaaf6786. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6786>

Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Carducci, A.; Federigi, I.; Liu, D.; Thompson, J. R.; Verani, M. (2020). *Making Waves: Coronavirus detection, presence and persistence in the water environment: State of the art and knowledge needs for public health. Water research*, 179, 115907. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115907>

Cashdollar, J. L.; Wymer, L. (2013). *Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. Journal of applied microbiology*, 115(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jam.12143>

Centers for Disease Control and Prevention; Atlanta: (2020). *Interim laboratory biosafety guidelines for handling and processing specimens associated with Coronavirus disease 2019 (COVID-19)* [Internet] Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>.

Chomzynski, P.; Mackey, K. (1995). *Modification of the TRI reagent [TM] procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. Biotechniques* 19, 942–945.

Collivignarelli, M. C.; Collivignarelli, C.; Carnevale Miino, M.; Abbà, A.; Pedrazzani, R.; Bertanza, G. (2020). *SARS-CoV-2 in sewer systems and connected facilities. Process safety and environmental protection: transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part B*, 143, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.06.049>

Cullen, A.C.; Frey, H.C.; Frey, C.H. (1999). *Probabilistic techniques in exposure assessment: a handbook for dealing with variability and uncertainty in models and inputs. Springer Science & Business Media*.

Daughton, C.G.; Jones-Lepp, T.L. (2001). *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues LK- In ACS symposium series; 791 TA - TT -. Am. Chem. Soc.* <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>

Daughton C. G. (2020). *Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. The Science of the total environment*, 736, 139631.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139631>

Danecek, P.; Bonfield, J.K.; Liddle, J.; Marshall, J.; Ohan, V.; Pollard, M.O.; Whitwham, A.; Keane, T.; McCarthy, S.A.; Davies, R.M.; Heng, L. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* 10, giab008.

<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>

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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028043>

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.*

<https://doi.org/10.1016%2Fj.coesh.2020.06.001>

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.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 357–371.

<https://doi.org/10.1128/mmbr.69.2.357-371.2005>

Fongaro, Gislaine; Silva, Hugo; Mahdy, El; Magri, Maria; Schissi, Camila; Moreira, Mariana; Lana, Maria; Lacerda, Elisangela; Barardi, Celia. (2015). *Enteric viruses as contaminants and bioindicators in environmental samples: A review.* *Reviews & Research.* 20. 10.17525/vrrjournal.v20i2.255.

<http://dx.doi.org/10.17525/vrrjournal.v20i2.255>

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.* *Sci. Total Environ.* 743, 140832.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140832>.

Gundy, P. M.; Gerba, C. P.; Pepper, I. L. (2009). *Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater.* *Food and Environmental Virology*, 1(1), 10.

<https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>

Haramoto, E.; Katayama, H.; Utagawa, E.; Ohgaki, S. (2009). *Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. Journal of virological methods*, 160(1-2), 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.05.002>

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. Sci. Total Environ.* 737, 140405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405>.

Hellmér, M.; Paxéus, N.; Magnius, L.; Enache, L.; Arnholm, B.; Johansson, A.; Bergström, T.; Norder, H. (2014). *Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. Appl. Environ. Microbiol.* 80 (21), 6771–6781. doi:10.1128/AEM.01981-14.

Guía instructiva para la detección del SARS-CoV-2 en agua residual; Lima: (2021). *HELVETAS PERU* [Internet] Disponible en: <https://www.cooperacionsuiza.pe/wp-content/uploads/2022/08/GUIA-INSTRUCTIVA-2.pdf>

Kantor, R. S.; Nelson, K. L.; Greenwald, H. D.; Kennedy, L. C. (2021). *Challenges in Measuring the Recovery of SARS-CoV-2 from Wastewater. Environmental science & technology*, 55(6), 3514–3519. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08210>

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>

Kitajima, M.; Ahmed, W.; Bibby, K.; Carducci, A.; Gerba, C. P.; Hamilton, K. A.; Haramoto, E.; Rose, J. B. (2020). *SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. The Science of the total environment*, 739, 139076. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>

Kojima, K.; Bennett, A.; Blacksell, S.; Heisz, M.; Makison Booth, C.; McKinney,

M.; Summermatter, K. (2020). *Laboratory biosafety manual*. ISBN: 978-92-4-001131-1

Larsen, L.E. (2000). Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet. Scand.* 41, 1–24. <https://doi.org/10.1186/bf03549652>

Le Bonté, S., Pons, M.-N., Potier, O. & Rocklin, P. (2008). *Relation Between Conductivity and Ion Content in Urban Wastewater*. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 21(4), 429–438. <https://doi.org/10.7202/019165ar>

Lescure, F.; Bouadma, L.; Nguyen, D; Parisey, M.; Wicky, P.; Behillil, S. (2020) Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet*. Volume 20, Issue 6 (697-706). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30200-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30200-0)

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*, 38, 101544. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101544>

Louten J. (2016). *Virus Structure and Classification*. *Essential Human Virology*, 19–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>

Mallapaty, S. (2020). *How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak*. *Nature*, 580(7802), 176-177. <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00973-x>

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*. In *Current Opinion in Environmental Science and Health* (Vol. 17, pp. 1–7). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.04.006>

Marusteri, Marius & Bacarea, Vladimir. (2010). Comparing groups for statistical differences: How to choose the right statistical test?. *Biochemia Medica*. 20. 15-32. 10.11613/BM.2010.004.

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*.

Environ. Sci. Technol. Lett. [https:// doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357).

Mohapatra, S.; Menon, N. G.; Mohapatra, G.; Pisharody, L.; Pattnaik, A.; Menon, N. G.; Bhukya, P. L.; Srivastava, M.; Singh, M.; Barman, M. K.; Gin, K. Y.; Mukherji, S. (2021). *The novel SARS-CoV-2 pandemic: Possible environmental transmission, detection, persistence and fate during wastewater and water treatment. The Science of the total environment*, 765, 142746. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142746>

Mota, C. R.; Bressani-Ribeiro, T.; Araújo, J. C.; Leal, C. D.; Leroy-Freitas, D.; Machado, E. C.; Espinosa, M. F.; Fernandes, L.; Leão, T. L.; Chamhum-Silva, L.; Azevedo, L.; Morandi, T.; Freitas, G.; Costa, M. S.; Carvalho, B. O.; Reis, M.; Melo, M. C.; Ayrimoraes, S. R.; Chernicharo, C. (2021). *Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. Water research*, 202, 117388. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117388>

Nemudryi, A.; Nemudraia, A.; Wiegand, T.; Surya, K.; Buyukyoruk, M.; Cicha, C.; Vanderwood, K. K.; Wilkinson, R.; Wiedenheft, B. (2020). *Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. Cell reports. Medicine*, 1(6), 100098. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100098>.

OMS, (2020) - *Laboratory biosafety manual, 4th edition*. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

Pardo-Figueroa, B.; Mindreau-Ganoza, E.; Reyes-Calderon, A; Yufra, S.P.; Solorzano-Ortiz, I.M.; Donayre-Torres, A.J.; Antonini, C.; Renom, J.M.; Quispe, A.M.; Mota, C.R.; Chernicharo, A.L.; Carbajal, M.; Santa-María, M. (2022). *Spatiotemporal Surveillance of SARS-CoV-2 in the Sewage of Three Major Urban Areas in Peru: Generating Valuable Data Where Clinical Testing Is Extremely Limited. ACS ES&T Water*. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00065>

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.; Ko, A. I.; Malik, A. A.; Wang, D.; Wang, M.; Warren, J. L.; Weinberger, D. M.; Arnold, W.; Omer, S. B. (2020). *Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. Nature biotechnology*, 38(10), 1164–1167. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>

Pinon, A.; Vialette, M. (2019). *Survival of viruses in water. Intervirology* 61, 214–222. <https://doi.org/10.1159/000484899>

Polo, D.; Quintela-Baluja, M.; Corbishley, A.; Jones, D. L.; Singer, A. C.; Graham, D. W.; Romalde, J. L. (2020). *Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 - approaches and challenges for surveillance and prediction. Water research*, 186, 116404. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116404>

Randazzo, W.; Truchado, P.; Cuevas-Ferrando, E.; Simón, P.; Allende, A.; Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water research*, 181, 115942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>

Royston, J.P., 1982. *An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples. J. R. Stat. Soc. Ser. C (Applied Stat.* 31, 115–124. <https://doi.org/10.2307/2347973>

Sabatino, C. M.; Maier, S. (1980). *Differential inactivation of three bacteriophages by acid and alkaline pH used in the membrane adsorption-elution method of virus recovery. Canadian journal of microbiology*, 26(12), 1403–1407. <https://doi.org/10.1139/m80-233>

SENAMHI 2021a Dirección de Meteorología y Evaluación Ambiental Atmosférica Subdirección de Predicción Climática- SENAMHI-Perú, Abril-Junio 2021: <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/02262SENA-7.pdf>

SENAMHI 2021b Dirección de Meteorología y Evaluación Ambiental Atmosférica Subdirección de Predicción Climática- SENAMHI-Perú, Julio-Setiembre 2021: <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/02262SENA-10.pdf>

SENAMHI 2021c Dirección de Meteorología y Evaluación Ambiental Atmosférica Subdirección de Predicción Climática- SENAMHI-Perú, Octubre-Diciembre 2021: <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/02262SENA-13.pdf>

Sims, N.; Kasprzyk-Hordern, B. (2020). *Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. Environment international*, 139, 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>

Singer, A. C., Järhult, J. D., Grabic, R., Khan, G. A., Fedorova, G., Fick, J., Lindberg, R. H., Bowes, M. J., Olsen, B., & Söderström, H. (2013). *Compliance to oseltamivir among two populations in Oxfordshire, United Kingdom affected by influenza A(H1N1)pdm09, November 2009--a waste water epidemiology study. PloS one*, 8(4), e60221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060221>

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. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.032>

Tian, Y.; Rong, L.; Nian, W.; He, Y. (2020). *Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. Alimentary pharmacology & therapeutics*, 51(9), 843–851. <https://doi.org/10.1111/apt.15731>

Trujillo, M.; Cheung, K.; Gao, A.; Hoxie, I.; Kannoly, S.; Kubota, N.; San, K.M.; Smyth, D.S.; Dennehy, J.J. (2021). Protocol for safe, affordable, and reproducible isolation and quantitation of SARS-CoV-2 RNA from wastewater. *PLoS One* 16, e0257454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257454>

Verbyla, M.E.; Symonds, E.M.; Kafle, R.C.; Cairns, M.R.; Iriarte, M.; Mercado Guzman, A.; Coronado, O.; Breitbart, M.; Ledo, C.; Mihelcic, J.R. (2016). *Managing microbial risks from indirect wastewater reuse for irrigation in urbanizing watersheds. Environ. Sci. & Technol.* 50, 6803–6813. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05398>

Wallis, C.; Melnick, J. L. (1967a). *Concentration of enteroviruses on membrane filters*. *Journal of virology*, 1(3), 472–477. <https://doi.org/10.1128/JVI.1.3.472-477.1967>

Wallis, C.; Melnick, J. L. (1967b). *Concentration of viruses from sewage by adsorption on millipore membranes*. *Bulletin of the World Health Organization*, 36(2), 219–225.

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*. *J. Am. Med. Assoc.*, 3–4 <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>.

Wigginton, Krista; Ye, Yinyin; Ellenberg, Robert. (2015). *Emerging Investigators Series: The source and fate of pandemic viruses in the urban water cycle*. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 1. 10.1039/C5EW00125K. <http://dx.doi.org/10.1039/C5EW00125K>

Wu, F.; Zhang, J.; Xiao, A.; Gu, X.; Lee, W. L.; Armas, F.; Kauffman, K.; Hanage, W.; Matus, M.; Ghaeli, N.; Endo, N.; Duvallet, C.; Poyet, M.; Moniz, K.; Washburne, A. D.; Erickson, T. B.; Chai, P. R.; Thompson, J.; Alm, E. J. (2020). *SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases*. *mSystems*, 5(4), e00614-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00614-20>

Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, Maday Y, Teyssou R, Richard E, Almayrac JL, Moulin L. *Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020*. *Euro Surveill*. 2020;25(50):pii=2000776. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2000776>

Xiao, F.; Sun, J.; Xu, Y.; Li, F.; Huang, X.; Li, H.; Zhao, J.; Huang, J.; Zhao, J. (2020). *Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19*. *Emerging infectious diseases*, 26(8), 1920–1922. <https://doi.org/10.3201/eid2608.200681>

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.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>

Zerda, K. S., Gerba, C. P., Hou, K. C., & Goyal, S. M. (1985). Adsorption of viruses to charge-modified silica. *Applied and environmental microbiology*, 49(1), 91–95. <https://doi.org/10.1128/aem.49.1.91-95.1985>

Zhang, N., Gong, Y., Meng, F. et al. Comparative study on virus shedding patterns in nasopharyngeal and fecal specimens of COVID-19 patients. *Sci. China Life Sci.* 64, 486–488 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1783-9>

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*. *Environ. Health: Global Access Sci. Source* 4, 14. [doi:10.1186/1476-069X-4-14](https://doi.org/10.1186/1476-069X-4-14).

9. Anexos:

Tabla 2. Muestras de aguas residuales utilizadas en el estudio. El código de la cuenca está de acuerdo con los informados en Pardo-Figueroa et al 2022. GC, copias del genoma.

1. Muestras utilizadas para evaluar el efecto del acondicionamiento de muestras en la recuperación viral.			
Código del buzón	Fecha de muestreo (mes/día/año)	Concentración de SARS-CoV-2 * (CG/mL agua residual)	Código de la muestra
STP03	8/13/2021	156,84	-
STP03	8/20/2021	131,02	-
STP04	8/11/2021	57,19	-
STP06	8/11/2021	122,14	-
STP06	8/19/2021	32,93	-
2. Muestras utilizadas para evaluar el efecto de los métodos de purificación de ARN en el análisis RT-qPCR y NGS. Marcadas con asteriscos están las muestras excluidas del análisis debido a que tienen cargas virales por debajo del Límite de Detección (LOD)			
Código del buzón	Fecha de muestreo (mes/día/año)	Concentración de SARS-CoV-2 * (CG/mL agua residual)	Código de la muestra
SN03	7/13/2021	29,51	10_Ns
SN04*	7/16/2021	2,13	4_Ns
SN04*	6/18/2021	8,59	12_Ns
SN05	6/16/2021	88,23	2_Ns
SN07	10/07/2021	60,14	21_Ns
SN08	10/14/2021	51,65	23_Ns
SN10	6/21/2021	286,31	5_Ns
SN11	6/23/2021	215,24	8_Ns
SN12	7/21/2021	1215,81	15_Ns
STP01	9/30/2021	40,26	17_Ns
STP02	7/20/2021	22,49	19_Ns
STP02	10/05/2021	103,49	22_Ns
STP02	10/07/2021	87,66	14_Ns
STP02	9/30/2021	49,03	18_Ns
STP03	7/19/2021	154,08	1_Ns
STP03	6/14/2021	229,38	13_Ns
STP04	7/14/2021	145,89	24_Ns

STP04	7/23/2021	44,73	3_Ns
STP04	6/16/2021	53,99	11_Ns
STP04	10/15/2021	45,49	20_Ns
STP04	9/29/2021	49,42	16_Ns
STP06	6/22/2021	426,71	6_Ns
STP06	6/23/2021	191,41	9_Ns
STP07	6/22/2021	703,61	7_Ns
SN03	7/13/2021	64.2	10_Tr
SN04*	7/16/2021	83.0	4_Tr
SN04*	6/18/2021	3.8	12_Tr
SN05	6/16/2021	81.9	2_Tr
SN07	10/07/2021	77.3	21_Tr
SN08	10/14/2021	108.2	23_Tr
SN10	6/21/2021	322.9	5_Tr
SN11	6/23/2021	759.2	8_Tr
SN12	7/21/2021	584.1	15_Tr
STP01	9/30/2021	19.3	17_Tr
STP02	7/20/2021	8.3	19_Tr
STP02	10/05/2021	51.3	22_Tr
STP02	10/07/2021	75.3	14_Tr
STP02	9/30/2021	38.1	18_Tr
STP03	7/19/2021	141.5	1_Tr
STP03	6/14/2021	304.9	13_Tr
STP04	7/14/2021	35.2	24_Tr
STP04	7/23/2021	90.0	3_Tr
STP04	6/16/2021	48.1	11_Tr
STP04	10/15/2021	162.6	20_Tr
STP04	9/29/2021	58.1	16_Tr
STP06	6/22/2021	684.2	6_Tr
STP06	6/23/2021	173.0	9_Tr
STP07	6/22/2021	438.5	7_Tr

3. Muestras utilizadas para evaluar el efecto de los parámetros fisicoquímicos basales en la cuantificación viral

Código del buzón	Fecha de muestreo (mes/día/año)	Concentración de SARS-CoV-2 * (CG/mL agua residual)	Código de la muestra
SN01	5/18/2021	177,11	-
SN01	5/25/2021	17,66	-
SN01	6/01/2021	19,77	-
SN01	6/15/2021	5,89	-

SN01	6/22/2021	8,04	-
SN01	8/17/2021	7,3	-
SN02	5/24/2021	52,49	-
SN02	6/07/2021	112,53	-
SN02	6/14/2021	27,13	-
SN02	7/05/2021	17,17	-
SN02	7/26/2021	25,01	-
SN03	5/18/2021	10,02	-
SN03	5/25/2021	8,94	-
SN03	6/01/2021	89,45	-
SN03	6/08/2021	67,91	-
SN03	6/29/2021	12,43	-
SN03	7/06/2021	30,34	-
SN03	7/27/2021	17,12	-
SN04	5/21/2021	12,3	-
SN04	5/28/2021	1,37	-
SN04	6/04/2021	4,37	-
SN04	6/25/2021	1,52	-
SN04	7/02/2021	4,56	-
SN04	7/23/2021	6,7	-
SN05	5/19/2021	0,18	-
SN05	5/26/2021	21,94	-
SN05	6/16/2021	88,23	-
SN05	6/23/2021	1,25	-
SN05	6/30/2021	2,52	-
SN05	7/07/2021	81,57	-
SN05	8/18/2021	7,22	-
SN06	5/19/2021	0,3	-
SN06	5/26/2021	4,59	-
SN06	6/02/2021	59,91	-
SN06	6/09/2021	74,8	-
SN06	6/23/2021	5	-
SN06	6/30/2021	20,55	-
SN06	8/18/2021	ND	-
SN07	5/20/2021	0,38	-
SN07	6/10/2021	26,03	-
SN07	6/24/2021	0,38	-
SN07	7/01/2021	17,3	-
SN07	8/19/2021	47,99	-
SN08	5/20/2021	32,79	-
SN08	5/27/2021	1,75	-
SN08	6/03/2021	13,72	-

SN08	6/10/2021	30,81	-
SN08	6/17/2021	37,09	-
SN08	7/01/2021	6,15	-
SN08	7/08/2021	32,48	-
SN08	8/19/2021	ND	-
SN09	5/24/2021	26,56	-
SN09	5/31/2021	56,79	-
SN09	6/07/2021	81,83	-
SN09	6/14/2021	61,06	-
SN09	6/21/2021	4,24	-
SN09	7/26/2021	9,68	-
SN10	4/26/2021	16,17	-
SN10	5/03/2021	486,75	-
SN10	5/17/2021	81,43	-
SN10	5/31/2021	284,69	-
SN10	6/07/2021	606,92	-
SN10	6/14/2021	405,23	-
SN10	6/21/2021	286,31	-
SN10	7/19/2021	58,02	-
SN10	8/19/2021	46,49	-
SN11	4/28/2021	10,08	-
SN11	5/05/2021	375,68	-
SN11	5/19/2021	515,26	-
SN11	6/02/2021	1157,39	-
SN11	6/09/2021	453,2	-
SN11	6/16/2021	295,83	-
SN11	6/23/2021	215,24	-
SN11	7/19/2021	99,6	-
SN11	8/19/2021	9,85	-
SN12	8/18/2021	8,84	-
SN13	8/18/2021	6,65	-
STP03	5/24/2021	19,92	-
STP03	5/28/2021	7,84	-
STP03	5/31/2021	38,89	-
STP03	6/07/2021	101,26	-
STP03	6/28/2021	39,49	-
STP03	7/23/2021	9,44	-
STP03	7/26/2021	499,53	-
STP04	5/26/2021	6,51	-
STP04	5/28/2021	1,37	-
STP04	6/09/2021	73,99	-
STP04	6/11/2021	80,01	-

STP04	6/16/2021	53,99	-
STP04	6/18/2021	44,39	-
STP04	6/23/2021	4,89	-
STP04	6/25/2021	6,12	-
STP04	7/01/2021	14,67	-
STP04	7/23/2021	44,73	-
STP04	8/18/2021	ND	-
STP05	5/19/2021	3,67	-
STP05	5/26/2021	7,74	-
STP05	5/31/2021	43,94	-
STP05	6/02/2021	74,99	-
STP05	6/07/2021	123,74	-
STP05	6/14/2021	98,83	-
STP05	6/16/2021	64,82	-
STP05	6/21/2021	0,54	-
STP05	7/26/2021	19,93	-
STP05	8/18/2021	3,01	-
STP06	7/21/2021	291,89	-

Tabla 3: Variabilidad estadística de los parámetros fisicoquímicos en un total de 123 muestras independientes de aguas residuales utilizadas para evaluar su efecto en la recuperación viral.

Medidas de variación de parámetros fisicoquímicos					
Parámetro	Media (μ)	Mediana	Varianza (σ^2)	Desviación estándar (σ)	Coefficiente de variación (CV)
pH	7.5	7.4	1.4	1.2	0.16
Temperatura	16.4	17.01	7.3	2.7	0.16
Conductividad	1478.0	1353.0	158634.9	399.9	0.27
DQO	664.4	646.8	99321.3	316.4	0.47

Tabla 4: Datos de secuenciación (recuento de lectura) del análisis NGS de muestras de ARN purificadas de aguas residuales con el kit de extracción *NucleoSpin RNA Stool* (_Ns) y un método basado en TRIzol modificado (_Tr). Lecturas sin procesar, número de lecturas obtenidas después de la secuenciación de Illumina. Lecturas recortadas, lecturas totales que permanecieron de alta calidad después del filtrado Trimmomatic. Lecturas coincidentes, lecturas totales que coincidieron con la base de datos de referencia de GISAID.

Código de muestra	Método de extracción	Raw reads	Trimmed reads	Matched reads
1_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	269581	249600	40322
2_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	530286	493273	69229
3_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	143390	132718	586
4_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	165418	151195	10
5_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	605545	560180	247041
6_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	151126	139073	20655
7_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	317742	298272	197372
8_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	477740	441315	135961
9_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	624626	572629	262740
10_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	612632	566782	30642
11_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	435290	402040	89807
12_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	102572	93093	34
13_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	116653	107678	0

14_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	194191	177622	14691
15_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	292117	274164	172479
16_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	129738	119458	0
17_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	96955	87883	0
18_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	42880	38800	0
19_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	74032	66270	0
20_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	2	2	2
21_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	30966	27641	0
22_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	130989	120683	3
23_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	166326	153123	0
24_Ns	<i>NucleoSpin RNA Stool</i>	83610	77323	0
1_Tr	TRizol	134687	126296	119162
2_Tr	TRizol	57656	53812	1907
3_Tr	TRizol	15811	14557	2292
4_Tr	TRizol	127477	119838	100489
5_Tr	TRizol	300314	280519	269046
6_Tr	TRizol	394740	373649	357161
7_Tr	TRizol	731445	690737	685499
8_Tr	TRizol	68528	64028	34538
9_Tr	TRizol	492997	465567	458954
10_Tr	TRizol	214170	197091	98110
11_Tr	TRizol	399054	373688	358769
12_Tr	TRizol	82548	76174	36121
13_Tr	TRizol	486770	460627	321598
14_Tr	TRizol	498980	471736	294410

15_Tr	TRizol	627483	593653	488310
16_Tr	TRizol	540452	506773	489615
17_Tr	TRizol	100156	95104	87051
18_Tr	TRizol	86500	78336	74555
19_Tr	TRizol	453055	426890	361363
20_Tr	TRizol	549843	517337	419274
21_Tr	TRizol	206156	194517	157672
22_Tr	TRizol	441956	410954	260724
23_Tr	TRizol	407455	382250	248690
24_Tr	TRizol	411051	389900	252113

* Los valores son el promedio de 3 réplicas de RT-qPCR.