



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, UNAN-MANAGUA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
“LUIS FELIPE MONCADA”
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO

SEMINARIO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA

Tema:

El diagnóstico microbiológico en la infección por SARS-CoV-2.

Sub Tema:

Presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales, enero 2020 - octubre 2021.

Autores:

- Br. Genesis Nohemi Mendoza Alvarado.
- Br. Ivonne de los Ángeles Martínez Escorcia.

Tutora: MSc. Kenia Lizeth García Rosales.

Febrero Managua, Nicaragua.

Dedicatoria

A Dios por brindarme el privilegio de vivir e iluminarme cada día. A mis padres **Pedro José Martínez** y **María Escorcía García** los cuales me han inculcado principios y valores fundamentales para lograr ser una gran persona, por sus consejos que me ayudaron a ver la vida desde el mejor punto de vista, a actuar con honestidad, disciplina y rectitud para formarme como una gran profesional. A mis hermanos, tíos, amigos y a las personas que me han brindaron más que un apoyo y que se convirtieron en parte de mi familia durante estos años de formación profesional.

Br. Ivonne de los Ángeles Martínez Escorcía

Dedico con todo mi corazón a Dios, por brindarme la vida y permitirme continuar en mi formación profesional, que sin él no lo pudiese haber logrado. A mi madre **Ruth Nohemí Alvarado**, que me brinda de su gran amor cada día, su paciencia y sus valiosos consejos que me ayudaron a seguir adelante y no desistir de mi deseo de superación. De tal manera que ha sabido guiar mi vida por el sendero de la verdad e inculcándome valores para ser un mejor ser humano, a fin de poder honrar a mi familia con los conocimientos adquiridos, brindándome el futuro con su esfuerzo y sacrificio por ofrecerme un mañana mejor. A mi hermano y amigos por su apoyo incondicional y amor que tienen hacia mí, que a lo largo de estos años, son parte de mi familia.

Br. Génesis Nohemí Mendoza Alvarado

Agradecimiento

Primeramente, agradecemos a Dios por habernos acompañado y guiado a lo largo de la carrera, por darnos las fuerzas para seguir y poder culminar. A nuestros padres por apoyarnos incondicionalmente en cada etapa de nuestra vida tanto espiritual como económica. A nuestros amigos que siempre estuvieron en los buenos y malos momentos. A los docentes quienes fueron base fundamental en la carrera, por su apoyo brindado durante estos cinco años y compartir su conocimiento.

A nuestra tutora **MSc. Kenia Lizeth García Rosales** quien nos ayudó con sus conocimientos y apoyo en la realización de este documento.

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue analizar la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales, enero 2020 - octubre 2021 además de documentar algunos de los estudios realizados en el mundo, describir la metodología utilizada, los resultados de los estudios documentados, el riesgo de transmisión y la importancia para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales, basada en la búsqueda de información por medio de libros, revistas científicas, artículos científicos.

Para esta investigación, se documentaron 8 estudios en total sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el mundo, realizados en Argentina (1), USA (2), Holanda (1), España (2), Francia (1) e India (1). Los estudios emplearon diferentes métodos para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales, de manera que, para la recolección de las muestras utilizaron métodos manuales y muestreadores automatizados y en cuanto a los métodos implementaron la ultracentrifugación, adsorción y precipitación con hidróxido de aluminio, precipitación con polietilenglicol (PEG), entre otros. Para la extracción y purificación de ácidos nucleicos se utilizaron los siguientes kits, ARN NucleoSpin, PowerFecal Pro, STARMag 96 x 4. La detección molecular se realizó mediante RT-qPCR, utilizando diferentes genes diana. En todos los estudios las muestras resultaron positivas. En Argentina se detectó ARN de SARS-CoV-2 en todas las muestras, además se cuantificó la concentración relativa de ARN utilizando conjuntos de N1 y N, en el país de Francia, todas las muestras procesadas dieron positivo para la presencia de genomas de SARS-CoV-2, en España, las muestras se consideraron positivas para Ct por debajo de 40, en USA, las muestras recolectadas dieron positivas para SARS-CoV-2, aunque las concentraciones de ARN viral disminuyeron constantemente y luego cayeron por debajo del límite de detección. En India, las muestras fueron positivas con todos los genes orf1ab, de proteína N y de proteína S. Por consiguiente, en los diferentes estudios el Ct utilizado varía entre 32 a 40 con medidas de 33 y 38 en cada uno de ellos, correspondiente a un rango de copias entre 10^5 y 10^6 copias/L.

En estos estudios nos indican que no existe algún riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales. La vigilancia basada en aguas residuales es un enfoque prometedor para el monitoreo proactivo de brotes.

Managua, 22 de febrero del 2022

Valoración del tutor

El presente seminario de graduación con el subtema “Presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales, enero 2020-octubre 2021”, contiene información científica actualizada, siendo un valioso aporte bibliográfico sobre esta temática de gran importancia para la salud pública.

Por lo antes expuesto, a través de la presente y en calidad de tutora, hago constar que el documento presentado por Br. **Génesis Nohemi Mendoza Alvarado** y Br. **Ivonne de los Ángeles Martínez Escorcía**, reúne los requerimientos establecidos para ser presentado ante el comité de evaluación del Departamento de Bioanálisis Clínico del Instituto Politécnico de la Salud, POLISAL, UNAN-Managua.

MSc. Kenia Lizeth García Rosales
Departamento de Bioanálisis Clínico
Tutora

Índice

I.	Introducción.....	1
II.	Justificación.....	3
III.	Objetivos.....	4
3.1.	Objetivo general:.....	4
3.2.	Objetivos específicos:.....	4
IV.	Desarrollo del subtema.....	5
4.1.	Origen del SARS-CoV-2	5
4.2.	Agente etiológico	5
4.3.	Características del virión	5
4.4.	Replicación viral	6
4.5.	Patogénesis	7
4.6.	Vías de transmisión del COVID-19.....	8
4.7.	SARS-CoV-2 en aguas residuales.....	11
4.8.	Estudios sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el mundo	12
4.9.	Metodología utilizada en la detección de SAR-CoV-2, en aguas residuales a partir de los estudios documentados.....	15
4.9.1.	Recolección de la muestra.....	15
4.9.2.	Métodos de concentración	17
4.9.3.	Extracción de ácidos nucleicos	19
4.9.4.	Metodos de detección molecular	22
4.10.	Principales resultados encontrados en los estudios documentados.	23
4.11.	Concentración del SARS-CoV-2 en aguas residuales	26
4.12.	Prevalencia del virus en aguas residuales	26
4.13.	Riesgo de trasmisión de SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales.....	26
4.14.	Importancia de la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales.....	27
V.	Diseño metodológico.....	29
VI.	Conclusiones.....	30
VII.	Bibliografía.....	32
VIII.	Anexos	35

I. Introducción

La enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2 fue detectada por primera vez en diciembre de 2019, cuando la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan (provincia de Hubei, China) informó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre un grupo de 27 casos de neumonía de etiología desconocida, con una exposición común a un mercado mayorista de marisco, pescado y animales vivos en la ciudad de Wuhan, incluyendo 7 casos graves. El 30 de enero de 2020, la OMS declaró una Emergencia de Salud Pública Internacional por esta causa, mientras el 11 de marzo definió la situación como “pandemia”.

El SARS-CoV-2 puede encontrarse como virus activo o en forma no infecciosa y discriminarse una u otra, a través de la cuantificación del RNA viral. Desde los primeros meses de la expansión del coronavirus SARS-CoV-2 por el mundo, algunos científicos buscaron huellas del patógeno en las aguas residuales. En el agua residual, el virus está expuesto a diversos factores que afectan su prevalencia en el medio: la temperatura, el contenido de materia orgánica, la presencia de microorganismos, entre otros, considerándose como los principales. Dado que sólo se requieren mil partículas virales para iniciar una infección, subraya, es importante determinar si el agua residual puede contener esta dosis de infección. Las aguas que viajan por el drenaje hacia las descargas municipales; provienen de los hogares, industrias, comercios o ser una mezcla de todos. SARS-CoV-2 puede replicarse en el tracto entérico de las personas, de este modo, puede ser desechado en las heces de los pacientes y descargado a las aguas residuales de sanitarios domésticos o de hospitales. Debido a esto, es importante la evaluación de los cambios temporales en la carga viral en el sistema de drenaje.

Se considera que el monitoreo del agua residual puede funcionar como un sistema de vigilancia de la aparición y desarrollo de la enfermedad, así como una herramienta de alerta de diseminación del agente que la provoca.

En muchas áreas del mundo, se liberan grandes cantidades de aguas residuales en el medio ambiente sin tratamiento o tratamiento adecuado, lo que deteriora nuestro medio ambiente y plantea graves riesgos para la salud humana. Las aguas residuales sin tratar y las aguas residuales parcialmente tratadas son vehículos para propagar enfermedades y en este caso,

un mecanismo potencial para que la COVID-19 se propague más rápido, por ejemplo, en áreas donde el saneamiento es deficiente o donde las comunidades están expuestas a alcantarillados abiertos y aguas negras.

El SARS-COV-2 ha sido detectado en diferentes países, mediante el empleo de técnicas moleculares. Existe un vínculo entre la COVID-19, las aguas residuales y el saneamiento. La pandemia ha puesto de manifiesto las amenazas y las oportunidades relacionadas con el saneamiento y la gestión de aguas residuales, alertando como la exploración de las aguas residuales podrían ayudar a detectar la propagación de este virus mediante el análisis de la presencia de Ácido Ribonucleico (ARN). La detección de su concentración podría ayudar a la adopción de medidas restrictivas en áreas específicas para contener el virus y su efecto en la comunidad local.

II. Justificación

Las aguas residuales son un vehículo natural para los contaminantes disueltos (nutrientes, químicos, patógenos), así como también para residuos sólidos. Como tal, la COVID-19 trae desafíos adicionales con el mayor uso de insumos médicos, incluyendo mascarillas y guantes de plástico, textiles y otros productos de un solo uso. Muchas personas que viven en condiciones desfavorables carecen de servicios básicos como el acceso a agua limpia y saneamiento básico, estas últimas garantizan buenos estándares de higiene y evitan la propagación de bacterias y virus, incluido el de la COVID-19. También se destaca la necesidad de invertir en instalaciones de tratamiento de aguas residuales y saneamiento adecuado.

Se sabe que la vía respiratoria y el contacto directo son los principales medios de infección de SARS-CoV-2, pero se asegura que el virus se excreta a través de las heces de persona sintomática, asintomática y recuperada, que posteriormente se eliminan en las aguas residuales de sanitarios domésticos o de hospitales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), Millones de personas en la Región de las Américas aún carecen de una fuente adecuada de agua potable e instalaciones seguras para la disposición y eliminación de las heces. Se estima que en esta región para el 2017, 28 millones de personas carecen de acceso a una fuente de agua mejorada, 83 millones de personas carecen de acceso a instalaciones de saneamiento mejorado, y 15.6 millones practican aún defecación al aire libre. A la fecha no sea confirmado la transmisión fecal-oral de SARS-CoV-2 sin embargo, durante la epidemia de SARS-CoV-1 en 2003 se demostró que los aerosoles generados desde las aguas residuales fueron una fuente de exposición a SARS-CoV-1. Por lo tanto, el presente trabajo, pretende **Analizar la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales, enero 2020 - octubre 2021** a partir de estudios realizados en el mundo sobre esta temática.

III. Objetivos

3.1. Objetivo general:

- Analizar la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales, enero 2020 - octubre 2021.

3.2. Objetivos específicos:

- Documentar los estudios sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el mundo.
- Describir la metodología utilizada en la detección de SARS en aguas residuales a partir de los estudios documentados.
- Discutir los resultados encontrados en los estudios documentados.
- Mostrar el riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales.
- Explicar la importancia de la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales.

IV. Desarrollo del subtema

4.1. Origen del SARS-CoV-2

El descubrimiento del nuevo coronavirus tiene su origen en un mercado de mariscos situado en la ciudad de China de Wuhan. El primer caso notificado fue el de un trabajador de dicho mercado, quien ingresó al hospital el 26 de diciembre de 2019 con neumonía grave e insuficiencia respiratoria. Al realizar diferentes análisis se encontró en esta persona el séptimo coronavirus con capacidad de infectar a humanos al que se denominó SARS-CoV-2. (Aguilar & Hernández, 2020)

Este virus tiene mucha similitud con los otros coronavirus ya conocidos, pero no son exactamente iguales. Su descubrimiento se une a cuatro coronavirus endémicos, causantes del 20% de los resfriados comunes, y a dos coronavirus epidémicos aparecidos en este siglo: el relacionado con el síndrome respiratorio severo agudo (SARS-CoV) y el relacionado con el síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV). El nuevo coronavirus tiene muchas similitudes con todos ellos, especialmente con el SARS-CoV, y con los dos coronavirus de origen animal. (Alcami et al, 2020)

4.2. Agente etiológico

El virus del síndrome respiratorio agudo severo tipo-2 (SARS-Cov-2), causante de COVID-19 se ubica taxonómicamente en la familia coronaviridae. Se subdivide en cuatro géneros: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus. Varios de estos causan enfermedades a animales domésticos y por lo tanto son principalmente de interés veterinario. Desde el punto de vista ecoepidemiológico se pueden clasificar en dos grupos: coronavirus adquiridos en la comunidad y coronavirus zoonóticos. (Díaz & Toro, 2020)

4.3. Características del virión

Los coronavirus son viriones con envoltura, de aspecto esférico, con un diámetro de 120 nm; su nucleocápside es de simetría helicoidal y contiene un genoma de ARN monocatenario, de polaridad positiva, con un tamaño de 27 a 32 kilobases. Las proteínas estructurales principales que se encuentran en la superficie de la membrana de las partículas virales son: la glucoproteína de la superficie de la espiga (S), la proteína de

envoltura pequeña (E), la proteína de matriz (M) y la proteína de la nucleocápside (N). La glicoproteína de la superficie es la esencial en la unión a los receptores de la célula huésped y determina el tropismo del huésped. (Peña & Rincón, 2020)

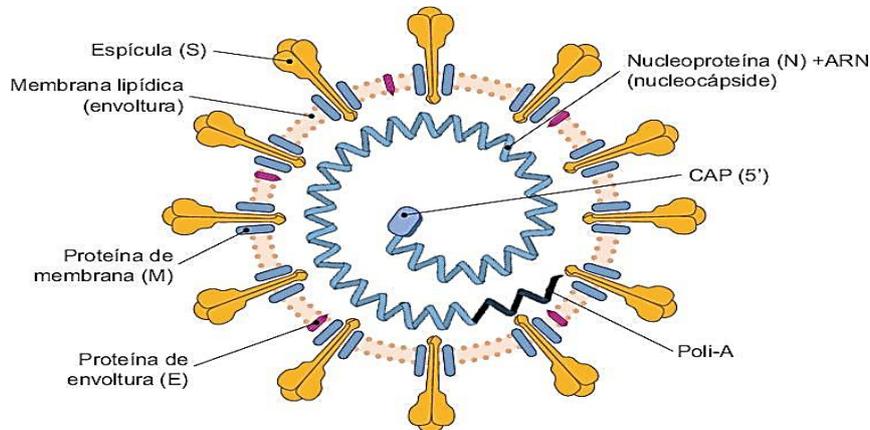


Figura 1. Diagrama esquemático del virión de SARS-CoV-2. Fuente: (Santos et al, 2021)

Se han secuenciado los genomas de gran número de aislados; el genoma de referencia propuesto por GenBank posee 29.903 pares de bases. Los genes que codifican para las cuatro proteínas estructurales figuran en el siguiente orden (del extremo 5' al 3'): S, E, M y N; y están precedidos por los ORFs (marcos de lectura abierta) designados como 1a y 1b, que codifican para 16 proteínas no estructurales. La comparación de los genomas de 101 cepas del virus reveló dos haplotipos, S y L, de los cuales S es la versión ancestral. (Ruiz & Jiménez, 2020)

4.4. Replicación viral

Al llegar a la célula blanco, la proteína S se une al receptor en la célula, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La proteína S es luego clivada por una proteína celular (TMPRSS2) en dos subunidades S1 Y S2. La subunidad S1 es el responsable de la unión con el receptor de la célula hospedadora, mientras tanto la subunidad S2 contiene el péptido para la función a la membrana celular. Luego de su entrada a la célula, mediante la formación de un endosoma, el virus es desenvuelto y el ARN viral es liberado al citoplasma para iniciarse en los ribosomas, la traducción de los genes ORF 1a y 1b en sus proteínas, las cuales realizan la replicación del genoma viral. Las proteínas estructurales codifican hacia el extremo 3' son traducida a partir de mRNA transcritas desde la hebra

de polaridad negativa que se forma durante la replicación del genoma viral. (Díaz & Toro, 2020)

Estas proteínas estructurales son posteriormente ensambladas con el genoma viral, en las membranas celulares internas del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, formándose las nuevas partículas virales. Finalmente, las vesículas que contienen los nuevos viriones se fusionan con la membrana celular para liberar los virus al exterior de la célula, proceso llamado exocitosis. (Díaz & Toro, 2020)

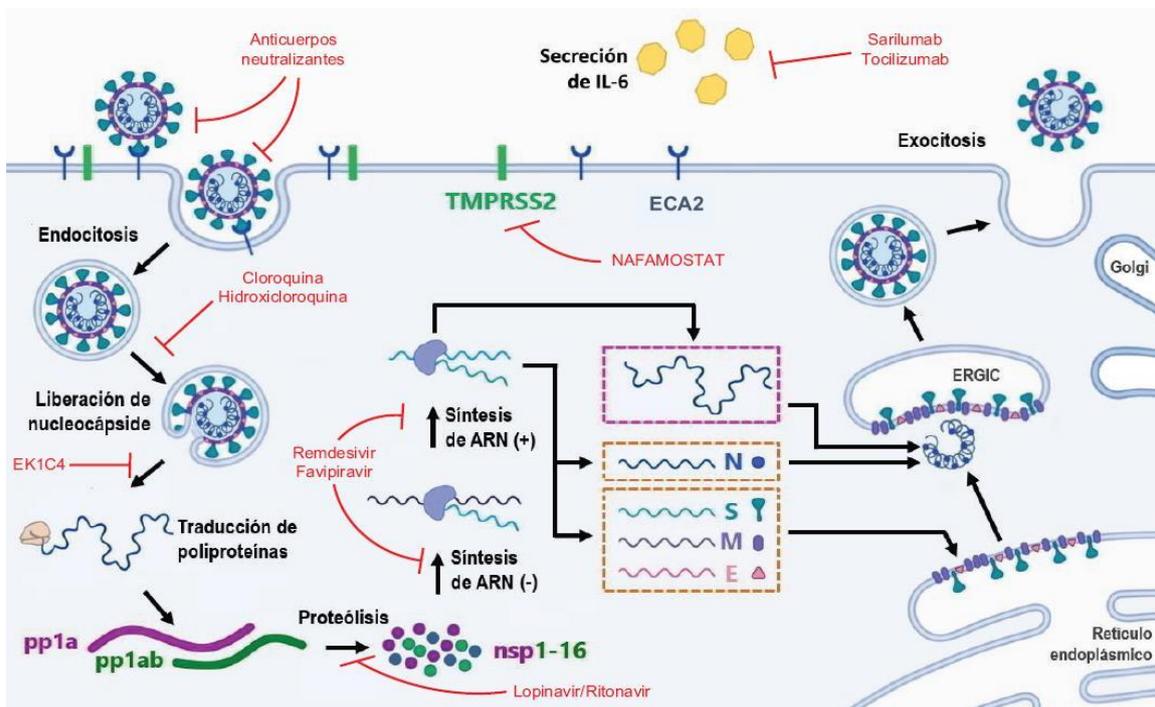


Figura 2. Replicación del SARS-CoV-2. Fuente: (Díaz & Toro, 2020)

4.5. Patogénesis

El virus puede acceder al tracto respiratorio a través de las membranas mucosas, especialmente la nasal, orofaríngea y laríngea, y luego ingresar a los pulmones por continuidad. Posteriormente, ingresa a la sangre desde los pulmones causando viremia y así adquiere acceso y ataca a todos los órganos que expresan ACE2. La ACE2 se encuentra presente en mayores cantidades en el riñón, los pulmones y el corazón, participan en la transformación de la angiotensina I en angiotensina 1-9 y de la angiotensina II en angiotensina 1-7. Estos productos finales tienen efectos

vasodilatadores que reducen la presión arterial, con efecto protector frente a la hipertensión, la arteriosclerosis y otros procesos vasculares y pulmonares. (Oliva, 2020)

Se ha observado que los casos graves de COVID- 19 presentan niveles de angiotensina II altos y que sus niveles se asocian con la carga viral y el daño pulmonar. También se ha observado que el SARS-CoV-2 induce la producción de daños cardíaco agudo e insuficiencia cardíaca, con un aumento de los niveles de troponina asociados a una mayor mortalidad. (Oliva, 2020)

4.6. Vías de transmisión del COVID-19

Las principales vías de propagación del SARS-CoV-2 son las gotículas respiratorias y el contacto directo. Cualquier persona que mantenga contacto directo con una persona infectada corre el riesgo de verse expuesto a gotículas respiratorias potencialmente infecciosas. La infección por el SARS-CoV-2 causa principalmente enfermedades respiratorias que van desde cuadros leves hasta cuadros graves y la muerte, sin embargo algunas de las personas infectadas por el virus nunca presentan síntomas.

4.6.1. Transmisión por contacto y por gotículas

El SARS-CoV-2 puede transmitirse por contacto directo, indirecto o estrecho con personas infectadas a través de las secreciones contaminadas (por ejemplo, la saliva, las secreciones respiratorias o las gotículas respiratorias) que son expulsadas cuando una persona infectada tose, estornuda, habla o canta. Las gotículas respiratorias tienen un diámetro de cinco a 10 micrómetros (μm); las gotas que tienen un diámetro inferior a 5 μm se denominan núcleos goticulares o aerosoles. (OMS, 2020)

La transmisión por gotículas respiratorias puede producirse cuando una persona está en contacto estrecho con una persona infectada que presenta síntomas respiratorios; en estas circunstancias, las gotículas respiratorias que contienen el virus pueden llegar a la boca, la nariz o los ojos de una persona expuesta y esto podría causar una infección. Además, podría producirse transmisión por contacto indirecto si un hospedero expuesto tiene contacto con un objeto o una superficie contaminados.

Por otro lado, la carga viral está directamente relacionada con el número de partículas virales que el individuo infectado puede emitir al hablar, estornudar o toser. Se ha detectado que el número de partículas de coronavirus alcanza un pico a los 5-6 días

después de la infección, con valores en el rango de 10^4 – 10^7 partículas por ml. La severidad de los síntomas también suele estar relacionada con la carga viral de modo que los síntomas suelen ser más severos en pacientes con una mayor carga viral.

4.6.2. Transmisión aérea

La transmisión aérea se define como la propagación de un agente infeccioso causada por la diseminación de núcleos goticulares (aerosoles) que siguen siendo infectantes tras permanecer suspendidos en el aire por tiempos prolongados y viajar distancias largas.

El SARS-CoV-2 puede transmitirse por vía aérea durante la realización de técnicas médicas en las que se produzcan aerosoles. La OMS, de consuno con la comunidad científica, ha analizado y valorado activamente la cuestión de si el SARS-CoV-2 también puede propagarse a través de aerosoles en los casos en los que no se realicen técnicas en las que se produzcan aerosoles, especialmente en entornos cerrados con mala ventilación. Las características físicas del aire exhalado y las corrientes han dado lugar a hipótesis sobre posibles mecanismos mediante los cuales el SARS-CoV-2 podría transmitirse a través de aerosoles. En esas teorías se propone que:

- Determinadas gotículas respiratorias producen aerosoles microscópicos (de menos de 5 μm) mediante evaporación.
- Al respirar y hablar con normalidad se producen exhalaciones de aerosoles.

Por consiguiente, podría ocurrir que una persona expuesta inhalara aerosoles y se contagiara si estos contienen una cantidad suficiente de virus como para infectar al hospedero. Sin embargo, aunque se desconocen la proporción de gotículas respiratorias que al evaporarse producen aerosoles, y la dosis infecciosa de viriones del SARS-CoV-2 viables que deben contagiar a un hospedero para causarle una infección, esos factores han sido objeto de estudio en relación con otros virus respiratorios. Hasta la fecha, no se ha demostrado que el SARS-CoV-2 se transmita por ese tipo de vía de diseminación de aerosoles; dadas las posibles repercusiones que tendría la confirmación de esa vía de transmisión, es necesario realizar mucha más investigación al respecto. (OMS, 2020)

4.6.3. Transmisión por fómites

Las secreciones respiratorias o las gotículas que las personas infectadas expulsan pueden contaminar las superficies y los objetos, lo que produce fómites. En dichas superficies es posible detectar, mediante RT-qPCR, viriones del SARS-CoV-2 viables o ARN vírico durante periodos que van desde horas hasta días, dependiendo del entorno, el ambiente (incluidos factores como la temperatura y la humedad) y el tipo de superficie; es posible detectar altas concentraciones de esas partículas especialmente en establecimientos sanitarios en los que se prestó asistencia a pacientes con COVID-19. (OMS, 2020)

Es posible que el SARS-CoV-2 se transmita indirectamente al tocar objetos contaminados con viriones procedentes de una persona infectada (por ejemplo, los estetoscopios o los termómetros) o superficies en el entorno adyacente, y, posteriormente, tocarse la boca, la nariz o los ojos. Aunque se dispone de datos científicos fiables en relación con la contaminación de superficies por el SARS-CoV-2 y el mantenimiento de la viabilidad de los viriones en determinadas superficies, no existen informes específicos en los que se haya corroborado directamente la transmisión por fómites. (OMS, 2020)

4.6.4. Otras vías de transmisión

También se ha detectado ARN del SARS-CoV-2 en otros tipos de muestras biológicas, por ejemplo, en la orina y heces de determinados pacientes. Este mecanismo de transmisión ocurre dada la capacidad de infección a las células del epitelio intestinal por la expresión del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) y la proteasa TMPRSS2. En algunos estudios se observó que existían viriones del SARS-CoV-2 viables en la orinas y en otros se logró cultivar el SARS-CoV-2 a partir de muestras de heces, pero hasta la fecha no se han publicados informes relativos a la transmisión del SARS-CoV-2 por medio de heces u orinas. (Aguilar & Hernández, 2020)

El riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 desde las heces de una persona infectada y por la vía fecal-oral parece ser bajo. Varios estudios han detectado fragmentos de ARN del virus SARS-CoV-2 en la materia fecal de pacientes a lo largo de la enfermedad y después de la recuperación. Hay estudios que informan de la presencia del virus con capacidad infectivas en heces, otros no han encontrado virus infecciosos en este medio. Asimismo, los virus eliminados son rápidamente inactivos durante el tránsito por el colon. (OMS; UNICEF, 2020)

En algunos estudios se ha comunicado que se detectó ARN de SARS-CoV-2 en plasma o en suero y que los viriones pueden replicarse en glóbulos sanguíneos. Sin embargo, aún no existen dudas sobre la importancia que tiene la transmisión hemática, también las bajas concentraciones víricas que se han registrado en plasma y suero indican que es posible que el riesgo de que se produzca la transmisión por esta vía sea bajo. (OMS, 2020)

4.7. SARS-CoV-2 en aguas residuales

El SARS-CoV-2 es un virus con envoltura, por lo que es menos estable en el entorno que los enterovirus humanos sin envoltura cuya transmisión por el agua es conocida (como los adenovirus, norovirus y rotavirus y el virus de la hepatitis A). Hasta hoy no se ha confirmado ningún caso de transmisión fecal-oral del virus ni hay evidencias científicas que indiquen que las aguas fecales sean una vía de transmisión del virus. Sin embargo, la detección del virus en muestras de aguas residuales podría ser una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica de la infección.

Aunque los síntomas respiratorios son los que se describen más frecuentemente en pacientes con COVID-19, varios estudios sugieren que el tracto gastrointestinal podría también verse afectado por SARS-CoV-2. En un reciente meta-análisis se ha visto que en 29 de las 35 publicaciones científicas analizadas con más de 6.000 pacientes con COVID-19, un 15% de los pacientes presentaban síntomas gastrointestinales, siendo los más comunes las náuseas o vómitos y la diarrea. Cabe señalar que un 10% de estos pacientes con COVID-19 presentaron síntomas gastrointestinales sin cuadro respiratorio. (Alcami, 2020)

Además, diferentes estudios han demostrado que el ARN del SARS-CoV-2 está presente en heces de pacientes con COVID-19 independientemente de que haya o no síntomas gastrointestinales o de la gravedad de la enfermedad. También se ha visto que el virus puede ser excretado en heces durante largos periodos de tiempo, durante la enfermedad y en la fase de convalecencia, siendo varios los estudios que lo detectan hasta varias semanas después de la negativización en muestras respiratorias. Finalmente, diversos grupos de investigación han conseguido aislar SARS-CoV-2 infeccioso a partir de muestras de heces de pacientes con COVID-19, demostrando así que el virus puede replicarse en el tracto intestinal. (Alcami, 2020)

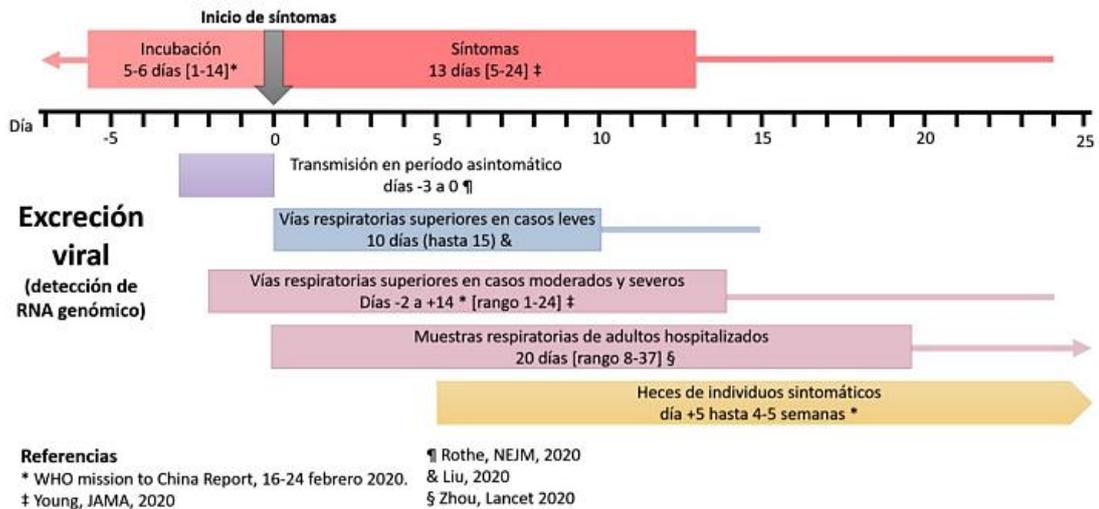


Figura 2. Historia natural de la infección por SARS-CoV-2 en individuos sintomáticos (detección de ARN VIRAL). Fuente: Sociedad Argentina de virología 2020.

La razón de la afectación del tracto intestinal parece estar en la interacción del virus con ACE2, el principal receptor del SARS-CoV-2, presente no solo en células pulmonares, sino también en las células epiteliales gastrointestinales. La interacción con estos receptores ha sido también descrita para el SARS-CoV causante de la epidemia de SARS en 2003, el cual también se consiguió aislar en cultivos celulares a partir de muestras de heces y para el que se llegó a evidenciar transmisión a partir de aguas residuales en un brote ocurrido en viviendas de Hong Kong con instalaciones de fontanería deficientes. (Alcami, 2020)

4.8. Estudios sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el mundo

El primer estudio sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales se hizo en los Países Bajos en muestras procedentes de varias ciudades y un aeropuerto. Los autores pudieron identificar el virus en todas las muestras recogidas durante el mes de marzo, cuando la prevalencia de COVID-19 era muy baja, de aproximadamente de 1-3 casos por 100.000 habitantes. Posteriormente, se han analizado aguas residuales en diferentes países, detectándose en todos ellos la presencia del SARS-CoV-2. (Medema et al, 2020)

En este trabajo se documentan ocho estudios realizados en los países de Argentina, Francia, España, USA, India, Holanda, a continuación, se presenta una tabla con los estudios sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales realizados en el mundo.

Tabla 1. Estudios sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el mundo.

Autores	País	Ciudad	Tipo de muestra	Método	Cuantificación viral/ carga viral	Diana de detección
(Wu et al, 2020)	USA	Massachusetts	Agua residuales	Extracción de ácido nucleico y RT-qPCR	N1: 10^4 - 2×10^5 N2: 3×10^4 - 10^5 N3: 10^4 - 10^5	gen N
(Wurtzer et al, 2020)	Francia	París	Aguas residuales tratadas y sin tratar	Extracción de ácidos nucleicos y RT-qPCR	5×10^4 a 3×10^6 RNA copias L ⁻¹	gen E
(Randazzo et al, 2020)	España	Murcia	Aguas residuales Sin tratar	Extracción de ARN y RT-qPCR	N1: 1.4×10^5 N2: 3.4×10^5 N3: 3.1×10^5	gen N
(Medema et al, 2020)	Holanda	Países bajos	Aguas residuales	Extracción de ARN y RT-qPCR	-----	gen N gen E
(Nemudryi et al, 2020)	USA	Bozeman	Aguas residuales sin tratar	Extracción de ARN y RT-qPCR	N1: 10^3 - 10^5 N2: 10^3 - 3×10^5	gen N
(Kumar et al, 2020)	India	Ahmedabad	Aguas residuales	Extracción de ARN y RT-PCR	2.419×10^8 copias/L	ORF1ab S gene N gene
(Balboa et al, 2020)	España	Ourense	Aguas residuales	Extracción de ARN y RT-qPCR	-----	gen N RdRp
(Iglesias et al, 2021)	Argentina	Buenos aire	Aguas superficiales crudas	Extracción de ARN y RT-qPCR	N1 Y N2: R ² : 0,84	gen N

4.9. Metodología utilizada en la detección de SAR-CoV-2, en aguas residuales a partir de los estudios documentados.

4.9.1. Recolección de la muestra

El objetivo del muestreo es obtener una parte representativa del material bajo estudio (agua, efluente industrial, agua residual, etc.), para lo cual se analizarán las variables fisicoquímicas de interés.

Para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales, en cada uno de los estudios, se describe el proceso de recolección de las muestras, todos los reportes recolectaron las muestras con un protocolo diferente, unas fueron tomadas manualmente mientras que otra se realizaron con equipos automatizados, es importante señalar que al momento de ser transportada al laboratorio se almacenaron a 4°C antes de su procesamiento.

- El estudio realizado en el país de Francia, comenzaron su muestreo desde el inicio de la epidemia el 5 de marzo de 2020. Para dicho estudio utilizaron muestreadores automatizados y se basó en un caudal, comenzando a las 7:00, terminando en D + 1, 7:00. Las muestras se tomaron por succión utilizando una tubería de PVC con una velocidad de ascensión superior a 0,8 m/s, y se recogieron en un tanque de polietileno refrigerado a 5°C (+/- 3°C). El volumen final recolectado fue de entre 8,7 L y 14 L. Las muestras se homogeneizaron cuidadosamente y se distribuyeron en una botella de polietileno de 2 L. (Wurtzer et al, 2020), igualmente, en el estudio realizado en USA, Bozeman, las muestras compuestas se recolectaron del afluentes sin tratar con un muestreador proporcional de flujo automático. El muestreador automático se configuró para recolectar 150mL de afluente por 150 000 galones de flujo (~5,68 × 105 L) de 7 a. m. a 7 a. m. Durante la recolección, la temperatura se mantuvo entre +2 y +6 °C y las muestras se almacenaron a +4 °C antes del procesamiento (2-3 h). La muestra compuesta se submuestreó en tres alícuotas de 500 mL. (Nemudryi et al, 2020)
- En Argentina se recolectaron muestras de agua superficial cruda entre el 5 de junio y el 7 de septiembre de 2020 en el barrio Villa Itatí, Municipio de Quilmes, Buenos Aires. Donde se tomaron muestras de agua de la única estación de bombeo del

vecindario. El muestreo lo realizaron semanalmente. Las muestras compuestas (200 ml cada 20 minutos) las tomaron en un periodo de 6 horas se recogieron de 8 a.m. a 2 p.m. en botellas de vidrio esterilizado. (Iglesias et al, 2021)

- En España se recolectaron muestras de agua residual tratada con afluentes, secundarios y terciarios de seis EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales) ubicadas en las principales ciudades de la Región de Murcia. Del 12 de marzo al 14 de abril de 2020, se recogieron un total de 54 muestras, tomadas a horas temprano de la mañana (7-12 am), recolectando 500-1000 ml de agua en recipientes de plástico HDPE (polietileno de alta densidad) estériles. (Randazzo et al, 2020)
- En Massachusetts se recolectaron en la fecha del 18 al 25 de marzo, se tomaron muestras compuestas de veinticuatro horas (1 litro) de aguas residuales crudas de una importante instalación de tratamiento de aguas residuales urbanas. Tras la recepción inicial, las muestras se colocaron en el gabinete de bioseguridad con UV durante 20 minutos y luego se pasteurizaron en un baño de agua a 60 ° C durante 90 minutos para inactivar el virus. Estudios previos mostraron que la pasteurización podría inactivar eficazmente el virus sin comprometer la calidad de la muestra. Las muestras pasteurizadas se utilizaron para la precipitación viral. (Wu et al, 2020)
- En el estudio documentado en el país de España, Se tomaron muestras de aguas residuales y lodos de la EDAR de Ourense en el noroeste de España. Las muestras con la cantidad 250 mL se tomaron dos veces por semana del 6 al 21 de abril de 2020. (Balboa et al, 2020)
- En Ahmedabad, India se recolectaron muestras de aguas residuales el 8 y el 27 de mayo de 2020 de la planta de tratamiento de aguas residuales (WWTP) de Old Pirana en Ahmedabad, Gujarat. Las muestras tomadas el 8 de mayo se transportaron en una caja de hielo y se refrigeraron a 4 °C hasta el 27 de mayo, cuando el siguiente lote de muestras se llevó al laboratorio y se analizó el mismo día. Ambos días el muestreo se realizó a las 11:30 am utilizando botellas estériles. (Kumar et al, 2020)

- En Holanda, se tomaron cuatro rondas de muestras en febrero y marzo de 2020. La primera ronda de muestreo resultó ser 3 semanas antes de que el sistema de vigilancia sanitaria de los Países Bajos reconociera el primer caso de COVID-19, el 27 de febrero. Las rondas de muestreo segunda, tercera y cuarta fueron 1 semana, 2,5 semanas y 4 semanas después de la epidemia en los Países Bajos. (Medema et al, 2020)

4.9.2. Métodos de concentración

A continuación, se mencionan algunos de los protocolos utilizados en los estudios para la concentración de SARS-CoV-2:

4.9.2.1. Ultracentrifugación a 200 000 x g por 1 h a 4 °C:

Las muestras recolectadas en Paris, Francia se homogeneizaron, luego se centrifugaron 11 ml a 200.000 x g durante 1 hora a 4 ° C utilizando una ultracentrífuga XPN80, equipada con un rotor oscilante. Los gránulos virales se resuspendieron en 200µL de tampón PBS 1X. (Wurtzer et al, 2020)

4.9.2.2. Adsorción y precipitación con hidróxido de aluminio

La bioadsorción es un proceso fisicoquímico que incluye los fenómenos de adsorción y absorción de moléculas e iones. Este método poco convencional busca principalmente la remoción de metales pesados en aguas residuales provenientes del sector industrial, usando como sorbente diferentes materiales de origen biológico (vivo o muerto), tales como: algas, hongos, bacterias, cáscaras de frutas, productos agrícolas y algunos tipos de biopolímeros. (Tejadas, Villabona, & Garces, 2015)

La precipitación química puede ser el principal y único método de depuración de aguas residuales industriales; puede ayudar a la operación de sedimentación cuando exista una gran concentración de sólidos disueltos y en suspensión, y se puede utilizar como un tratamiento anterior a un proceso biológico.

En Murcia, España, el método de concentración consistió en un protocolo de adsorción-precipitación de hidróxido de aluminio previamente descrito para concentrar virus entéricos de aguas residuales y efluentes. (Randazzo et al, 2020)

4.9.2.3. Precipitación con polietilenglicol (PEG)

Las soluciones acuosas de PEG sirven como agentes suspensores aumentando la solubilidad en agua de principios activos poco solubles, o para ajustar la consistencia o viscosidad de otros vehículos suspendidos.

En Argentina utilizaron el método de (PEG), donde la concentración viral se realizó a partir de 250 ml de muestra añadiendo 20 gramos de PEG8000 y 4,5 gramos de NaCl y luego centrifugando a 12.000 g durante 1 hora a 4°C. (Iglesias et al, 2021)

En Ahmedabad, India, las muestras de aguas residuales (50 ml) se centrifugaron a 4500 ×g durante 30 min, seguido de filtración de sobrenadante utilizando filtros de 0,22µm. Cada filtrado de aguas residuales se concentró utilizando los métodos de polietilenglicol (PEG). Para este método, PEG 9000 (80 g/L) y NaCl (17,5 g/L) se mezclaron con filtrado de 25 mL y este se incubó durante la noche a 17 °C y 100 rpm. Al día siguiente, la mezcla se centrifugaba a 13000 ×g durante 90 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en agua libre de RNasa de 300µL (Kumar et al, 2020)

En el estudio de Ourense, España realizaron dos métodos **ultrafiltración** para las muestras de aguas y **precipitación con polietilenglicol (PEG)** para las muestras de lodos. Las muestras de agua se concentraron por ultrafiltración. Para hacerlo, primero se centrifugaron suavemente 100 ml para eliminar partículas grandes a 4600 ×g durante 30 min para evitar bloquear la membrana de filtración. Los sobrenadantes se concentraron por filtración utilizando dispositivos centrífugos Amicon 15mL 10 K a una muestra de 1mL. Luego, 10mL de tampón de fosfato de pH salino 7.4 (PBS, con composición 137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ y 1.8mM KH₂PO₄) se añadieron y la muestra se concentró de nuevo a 1 ml. (Balboa et al, 2020)

Las muestras tomadas de las líneas de lodo se concentraron por precipitación con polietilenglicol (PEG). Luego, se agregó 1:8 (v/v) de tampón de glicina (0,05 M de glicina, 3% de extracto de carne de res) a 50 ml de lodo, incubado durante 2 h a 4 °C para

separar los virus unidos a la materia orgánica. Las muestras se centrifugaron a $8000 \times g$ durante 30 min y se filtraron a través de una membrana de polietersulfona (PES) de $0,45 \mu m$ para eliminar las células eucariotas y procariotas. Luego, los virus se precipitaron agregando 1:5 (v/v) de PEG 8000 (80 g/L) y NaCl (17,5 g/L) durante un temblor nocturno (150 rpm) a $4 \text{ }^\circ C$ y una centrifugación a $13.000 \times g$ durante 90 min. Las muestras se resuspendieron en tampón PBS pH 7.4 y se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ C$ para su posterior análisis. (Balboa et al, 2020)

En Massachusetts, la muestra pasteurizada se filtró primero a través de una membrana de $0,2 \mu m$ para eliminar células bacterianas y desechos. Para la prueba inicial, utilizamos un filtrado de 80 ml de dos muestras el 18 de marzo (sur y norte) para la precipitación viral con polietilenglicol 8000 y NaCl. Las muestras se agitaron a temperatura ambiente durante unos 15 minutos (hasta que los productos químicos se disolvieron por completo) y luego se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 2 h o hasta que se viera un gránulo. (Wu et al, 2020)

4.9.2.4. La concentración por ultrafiltración

Es un tipo de proceso de filtración por membranas que permite la reducción, retención y eliminación de sólidos suspendidos en el agua. Su uso y aplicación se ha extendido a diversas industrias, como consecuencia de su versatilidad y eficacia como tratamiento de agua de alta pureza.

En Bozeman, USA, Cada muestra de aguas residuales (500 ml) se filtró secuencialmente a través de filtros de membrana de $20 \mu m$, $5 \mu m$, $0,45 \mu m$, y se concentró hasta 150-200 μL utilizando concentradores UF Corning Spin-X con un corte de peso molecular de 100 kDa. (Nemudryi et al, 2020)

En los estudios documentados, realizaron una combinación de métodos de precipitación y filtración, como es el caso de los estudios realizados en EEUU y España.

4.9.3. Extracción de ácidos nucleicos

El procedimiento general de extracción de ácidos nucleicos consiste en tres etapas consecutivas: disgregación de las células o tejidos (lisis celular), inactivación de las nucleasas intracelulares y en separación de los ácidos nucleicos de los demás

componentes celulares. Existen métodos de extracción desde automatizados hasta aquellos que se realizan de forma manual.

Luego de obtener la muestra concentrada, el siguiente paso en el proceso consistió en extraer los ácidos nucleicos. En los estudios documentados, se han descrito algunos protocolos o kits utilizados para realizar la extracción de ARN del SARS-CoV-2. A continuación, se mencionan los kits de extracción de ARN:

Los estudios realizados en España e India utilizaron el kit de virus de ARN NucleoSpin de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones.

4.9.3.1. Kit de virus de ARN NucleoSpin

Permite la extracción del ARN de virus de forma rápida y eficaz gracias a un buffer de lisis optimizada con una alta concentración de GITC (tiocianato de guanidinio), están diseñados para la preparación rápida de ácidos nucleicos virales altamente puros a partir de muestras biológicas fluidas, por ejemplo, plasma, suero, orina, solución de lavado con hisopo, esputo licuado, pero sangre entera no sin diluir.

4.9.3.2. Kit PowerFecal Pro

Es eficaz para eliminar inhibidores de PCR incluso de tipos de heces más difíciles. Las muestras se agregan a un tubo batidor de perlas para una rápida y completa homogeneización. La lisis celular se produce por métodos mecánicos y químicos. ADN genómico total se captura en una membrana de sílice en un formato de columna giratoria. A continuación, el ADN se lava y se eluye de la membrana y listo para NGS, PCR y otras aplicaciones posteriores.

En París, Francia el concentrado viral se lisó y se extrajo utilizando el kit PowerFecal Pro, en un extractor automatizado QIA Symphony, de acuerdo con un protocolo de fabricante modificado utilizando un mayor volumen de muestras, esta tecnología combina la velocidad y la eficiencia de la purificación de ácidos nucleicos basada en la sílice con la manipulación de las partículas magnéticas. Los ácidos nucleicos extraídos se filtraron a través del kit de eliminación de inhibidores de PCR OneStep, son kits de limpieza de inhibidores de PCR que contienen todos los componentes necesarios para la eliminación eficiente de contaminantes que pueden inhibir las reacciones enzimáticas posteriores (por

ejemplo, PCR y RT) de preparaciones de ADN y ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante. (Wurtzer et al, 2020)

4.9.3.3. Kit de Cartucho Universal de STARMag 96 x 4

El propósito del Kit de Cartucho Universal de STARMag 96 x 4 es usado para aislamiento del ácido nucleico de tejidos, células, bacterias, sueros, plasma, sangre entera, muestras nasofaríngeas, aspirado nasofaríngeos, lavados broncoalveolares, muestras de: orina, fecales, saliva o genital o especímenes de citología con base líquida usando los siguientes instrumentos automatizados: STARlet y NIMBUS.

En Ourense, España la extracción de ARN se realizó en el departamento de Microbiología del *Complejo Hospitalario Universitario de Vigo*. La extracción de ácido nucleico de muestras concentradas de agua y lodo se realizó con MicrolabStarlet IVD (equipo automatizado para procesos de extracción, purificación y PCR) utilizando el kit de cartucho universal STARMag 96 × 4 de acuerdo con las especificaciones del fabricante. (Balboa et al, 2020)

4.9.3.4. RNeasy Mini Kit

Proporciona una purificación rápida de ARN de alta calidad de células, tejidos y levaduras utilizando columnas giratorias RNeasy con membrana de sílice con una capacidad de unión de 100 µg de ARN.

En Bozeman, USA el ARN total de las muestras concentradas se extrajo con RNeasy Mini Kit (QIAGEN) y se eluyó con 40 µL de tampón libre de RNasa. Este ARN se utilizó como plantilla para RT-qPCR (Nemudryi et al, 2020).

El estudio realizado en Argentina utilizó el **QiAamp Viral RNA Mini Kit** de QIAGEN Iglesias et al, 2021). Este Kit simplifica la purificación de ARN viral a partir de fluidos corporales libres de células con procedimientos rápidos de columna giratoria, de vacío o automatizados, además simplifica el aislamiento de ARN viral de hisopos nasotraqueales. No se requiere extracción con fenol-cloroformo. El

ARN viral se une específicamente a la membrana de sílice QIAamp mientras pasan los contaminantes. Los inhibidores de la PCR, como los cationes divalentes y las proteínas, se eliminan por completo en dos pasos de lavado eficientes, lo que permite que el ARN viral puro se eluya en agua o en un tampón provisto con el kit.

En el estudio realizado en Massachusetts, el ARN se extrajo utilizando el enfoque **TRIzol-cloroformo**, el reactivo TRIzol mantiene la integridad del ARN gracias a la inhibición altamente eficaz de la actividad de RNasa, al tiempo que destruye las células y disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de muestras. Brevemente, las muestras resuspendidas en el reactivo TRIzol se mezclaron completamente con cloroformo de 300 μ l durante 1 min y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min antes de la centrifugación ($16.000 \times g$, 15 min, $4^{\circ}C$). Seiscientos microlitros de fase acuosa se transfirieron a un nuevo tubo de 1,5 ml y se mezclaron completamente con un volumen igual de isopropanol. Después de la centrifugación a $16.000 \times g$ durante 10 min, el sobrenadante se desechó y el pellet se lavó dos veces con etanol al 75%. Se utilizaron treinta microlitros de agua de dietil pirocarbonato (DEPC) para recuperar el ARN. (Wu et al, 2020)

4.9.4. Metodos de detección molecular

4.9.4.1. PCR tiempo real

La PCR en tiempo real es una modalidad del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir: “En tiempo real” esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia, es proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción. (Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013)

En todos los estudios documentados el ARN viral se extrajo por RT-qPCR. En este método, el ARN se transcribe primero en ADN complementario (ADNc) mediante transcriptasa inversa a partir de ARN total o ARN mensajero (ARNm). El ADNc se utiliza entonces como plantilla para la reacción qPCR. Posteriormente la identificación de SARS-CoV-2 se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando

oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes ORF1ab, RdRP, gen N, gen E Y gen S. E codifica una de las proteínas de la envuelta del virus. N codifica la proteína de la nucleocápsida o armazón proteico del virus. RdRp, la enzima que copia el ARN del virus, llamada transcriptasa dependiente de ARN. (Lam et al, 2021)

Balboa et al, en su estudio, utilizó el gen N preferentemente para la cuantificación y el objetivo génico RdRP para confirmar la detección.

Kumar et al, analizaron los ARN para la detección de ORF1ab, gen N y gen S del SARS-CoV-2 y MS2 (control interno de procesos) mediante RT-PCR mediante TaqPath™ Covid-19 RT-PCR Kit.

Medema et al, en su estudio utilizaron cuatro conjuntos de cebadores/sondas: el conjunto N1-N3 de los CDC, que cada uno se dirige a una región diferente del gen de la nucleocápsida (N) y el conjunto contra el gen de la proteína de la envoltura (E).

Nemudryi et al e Iglesias et al, realizaron la RT-qPCR utilizando dos pares de cebadores (N1 y N2) y sondas de 2019-nCoV CDC. Randazzo et al, también utilizó un kit parecido pero con tres conjuntos de cebadores y sondas de oligonucleótidos dirigido a tres regiones diferentes del SARS-CoV-2 del gen de la nucleocápsida (N), de la misma forma se utilizó en el estudio realizado en Massachusetts por Wu et al.

Wurtzer et al, la detección y cuantificación la llevaron a cabo mediante el gen E y los resultados positivos se confirmaron mediante la amplificación de una región ubicada dentro del gen que codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp).

4.10. Principales resultados encontrados en los estudios documentados.

En el estudio que se realizó en Argentina, detectaron ARN de SARS-CoV-2 en todas las muestras, y también, pudieron cuantificar la concentración relativa de ARN de SARS-CoV-2 en estas muestras utilizando conjuntos de N1 y N2. Los valores umbral del ciclo RT-qPCR (Ct) variaron de 32 a 40 con medias de 35,4 y 34,4 para N1 y N2, respectivamente. En todas las muestras también se determinó la cantidad relativa de ARN PMMoV como indicador viral del contenido de heces humanas, obteniendo valores de Ct que oscilaron entre 30 y 33 con una media de 31,9. (Iglesias et al, 2021)

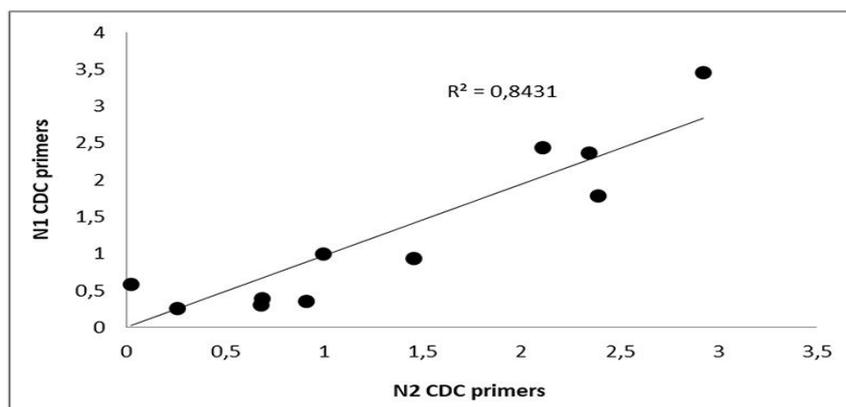


Figura 3. Comparación de las concentraciones relativas de ARN del SARS-CoV-2 medida en muestras de aguas superficiales. Fuente: (Iglesias et al, 2021)

En Francia, todas las muestras procesadas dieron positivo para la presencia de genomas de SARS-CoV-2, según lo evaluado por RT-qPCR en el gen E viral. Todas las muestras positivas fueron confirmadas por RT-qPCR en el gen viral RdRp. (Wurtzer et al, 2020)

En España, Murcia, las muestras se consideraron positivas para Ct por debajo de 40 y se titularon mediante el uso del control cuantificado de plásmidos para cada uno de los objetivos de RT-qPCR. El 83% (35 muestras positivas de 42) muestras influyentes y el 11% (2 de 18) muestras secundarias de agua tratada dieron positivo para al menos un objetivo de RT-qPCR del SARS-CoV-2. Ninguna de las muestras de efluentes terciarios (0 de 12) dio positivo para ninguna de las dianas RT-qPCR del SARS-CoV-2. Un número relevante de muestras de agua afluyente (12%) mostró Ct que oscilaba entre 37 y 40, a pesar de que se observaron Ct más bajos de 34-37 (29%). (Randazzo et al, 2020)

En la ciudad de Bozeman, USA, las muestras recolectadas dieron positivas para SARS-CoV-2, aunque las concentraciones de ARN viral disminuyeron constantemente y luego cayeron por debajo del límite de detección. Después de 1 mes de niveles indetectables de SARS-CoV-2, las aguas residuales comenzaron a dar positivo nuevamente a fines de mayo, lo que coincidió con un aumento de los casos de COVID-19 en la comunidad. (Nemudryi et al, 2020)

En Holanda los resultados de las muestras del 6 de febrero de 2020, no mostraron señales positivas para los conjuntos de cebadores N1-3 y E. Las muestras del 4 y 5 de marzo, mostró una señal positiva para el conjunto de imprimación/sonda N1 en muestras de aguas residuales de cuatro de las 6 EDAR muestreadas. En muestras de aguas residuales del 15 y 16 de marzo, 6 de las 7 EDAR mostraron una señal positiva con N1, y además 5 EDAR

también con N3 y 4 EDAR con el conjunto de imprimación/sonda E. (Medema et al, 2020)

En el país de India, las muestras fueron positivas con todos los genes orf1ab, de proteína N y de proteína S, con una concentración máxima estimada de $3,5 \times 10^2$ copias/L. (Kumar et al, 2020)

Tabla 2. Ciclos de amplificación (CT) de aguas residuales crudas y efluentes finales.

		ORF1ab	Gen de la proteína N	Gen de la proteína S	MS2
Aguas residuales crudas	8- mayo	35.52	35.39	39.56	22.46
	27-mayo	32.65	34.18	34.83	22.35
Efluentes final	8- mayo	---	---	---	22.24
	27-mayo	---	---	---	22.20

Fuente: (Kumar et al 2020).

Las muestras finales de efluentes tomadas el 8 y 27 de mayo fueron negativas (C_T valores >40) con los tres genes del SARS-CoV-2 examinados, lo que demuestra que los genes se redujeron significativamente por el tratamiento de la UASB (reactor anaerobio de flujo ascendente) y el estanque de aireación, esto demostró que los genes SARS-CoV-2 disminuyen durante los tratamientos, a través de un tratamiento secundario y un tratamiento terciario que incluye decantación. (Kumar et al, 2020)

En España, todas las muestras recolectadas fueron positivas para el control interno, bacteriófago MS2, aunque con eficiencia variable ($36,0 \pm 15,4\%$ para aguas residuales y $32,1 \pm 15,8\%$ para lodos), probablemente sea causada por la complejidad fisicoquímica y la variabilidad de las muestras de aguas residuales durante los diferentes días de muestreo. (Balboa et al, 2020)

Por último en Massachusetts, USA, las muestras de aguas residuales analizadas fueron positivas para SARS-CoV-2 por RT-qPCR (ciclo umbral [CT] < 40 ciclos). El título medio del SARS-CoV-2 estimado a partir de los tres conjuntos de cebadores oscila entre 57 y 303 copias por ml de aguas residuales. (Wu et al, 2020)

4.11. Concentración del SARS-CoV-2 en aguas residuales

Hasta el momento sea detectado en diferentes países, en aguas crudas (sin tratar) y tratada. El primer país en el que se detectó fue Holanda, luego Australia, Estados Unidos, Francia e Italia procedentes tanto de áreas de alta circulación como de baja circulación del virus. Con la ayudas de técnicas moleculares se ha detectado en aguas crudas una concentración de hasta 106 copias por litros y en aguas tratadas la cifras ha sido de 105 copias por litros. (Barreto, 2020)

4.12. Prevalencia del virus en aguas residuales

Existen pocos datos de prevalencia del virus en aguas residuales, y los factores que influyen en su desactivación en las mismas, constituyendo este un elemento importante para la evaluación de riesgo para la salud humana. Tampoco en los resultados de estas investigaciones se demuestra la presencia de SARS-CoV-2 en aerosoles de instalaciones de aguas residuales, pero se demostró, a escala de laboratorio, que este virus puede mantenerse activo en aerosoles hasta 16 h. Hay evidencias de que los virus de esta familia son inestables en el ambiente y que son más susceptibles a oxidantes como el cloro, al pH y a la temperatura, que la mayoría de los virus entéricos sin envoltura. No obstante, es necesario demostrar la efectividad de las operaciones y procesos de tratamiento de aguas residuales, individual y colectivamente, en la desactivación del virus, aunque los procesos de desinfección han sido efectivos en su inactivación. (Barreto, 2020)

4.13. Riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales

El riesgo para la salud humana asociado al ciclo del agua todavía está en debate, ya que la infectividad de las partículas virales en las aguas residuales y las heces aún no se ha confirmado, así como su potencial transmisión fecal-oral, también la posible transmisión del SARS-CoV-2 a través de las aguas residuales y parece poco probable dada la escasa

estabilidad del SARS-CoV-2 viable en las aguas residuales. Además, la elevada sensibilidad de los coronavirus patógenos humanos a las condiciones ambientales y desinfectantes sugiere un bajo riesgo de transmisión a través de aguas residuales, a pesar de que se debe realizar un análisis formal de riesgos.

En general, la vigilancia de las aguas residuales puede representar un enfoque complementario para estimar la presencia e incluso la prevalencia de COVID-19 en las comunidades. Esto representa una herramienta efectiva que debe explorarse más a fondo para dirigir la respuesta de salud pública, especialmente en casos de capacidad limitada para las pruebas clínicas, en un entorno en el que las pruebas en persona pueden no estar disponibles o pueden ser demasiado prohibitivas, el análisis longitudinal de las aguas residuales puede proporcionar estimaciones a nivel de la población de la carga del SARS-CoV-2. (Randazzo et al, 2020)

En los estudios documentados no concluyeron si existe o no un riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales, sin embargo, la detección en esta matriz, constituye una herramienta de gran importancia en la vigilancia epidemiológica, a continuación, se explica a detalle dicha importancia.

4.14. Importancia de la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales

En muchos países se están realizando investigaciones para detectar fragmentos virales de SARS-CoV-2 sin capacidad infectiva en aguas residuales y lodos fecales. Se han utilizado con éxito métodos para detectar la circulación del virus en la población, incluso entre los casos asintomáticos, como complemento a la vigilancia en seres humanos. Es necesario seguir investigando y creando capacidad en relación con los métodos analíticos (en particular en los lugares con baja cobertura de alcantarillado), la elaboración de modelos, la interpretación de los datos para fundamentar la adopción de decisiones y las medidas de salud pública. (OMS; UNICEF, 2020)

La vigilancia de la COVID-19 en aguas y lodos residuales puede servir como complemento a los datos de salud pública y proporcionar, por ejemplo, información sobre cuándo puede producirse un brusco aumento de los casos de 5 a 7 días antes de que ese aumento sea detectado por los centros de salud y las autoridades sanitarias. La vigilancia ambiental no debe utilizarse como sustituto de una vigilancia rigurosa de los casos de

COVID-19. Además, el objetivo principal de los gobiernos, las empresas de servicios públicos y las inversiones debe centrarse en la continuidad y la ampliación de los servicios de saneamiento gestionados de forma segura para brindar protección contra la COVID-19 y otras enfermedades infecciosas. (OMS; UNICEF, 2020)

La vigilancia de aguas residuales puede proporcionar una herramienta alternativa y posiblemente temprana para detectar patógenos en poblaciones de manera integrada cuando las investigaciones en humanos son difíciles de realizar por razones logísticas, éticas o económicas, incluso en países de bajos recursos afectados por la pandemia de COVID-19. Además, la recolección de aguas residuales a nivel municipal o comunitario puede permitir una detección más granular del SARS-CoV-2 en ciudades con menor carga de enfermedad covid-19, funcionando, así como un sistema de alerta temprana para ayudar a promulgar preventivamente medidas de salud pública antes de la aparición generalizada de la enfermedad.

V. Diseño metodológico

5.1. Tipo de estudio

Se realizó una investigación descriptiva sobre SARS-CoV-2 en aguas residuales, fundamentada en la consulta de diversos documentos como fuente de información, que permite describir y examinar el tema en particular.

5.2. Área de estudio

Área de virología, rama de la microbiología se basa en el estudio de los virus y las enfermedades que originan. El estudio se centra en el virus SARS-CoV-2 causantes de enfermedades respiratorias.

5.3. Recolección de la información

El método para la recolección de la información fue de fuentes obtenidas de artículos de revistas científicas, informes, libros, páginas web. La información reunida fue organizada y analizada de forma que cumplan con los objetivos planteados en dicha investigación.

5.4. Instrumento de recolección

Para la recolección de la información se realizó tablas y un bosquejo del subtema conforme a los objetivos planteados para proceder a la búsqueda y análisis de la información.

5.5. Presentación de la información

La información fue digitada en el programa Microsoft office Word 2017, para la presentación del trabajo se utilizó el programa Microsoft Power Point 2016.

5.6. Ética y confidencialidad de los datos

Al realizar esta investigación no se utilizó ni una técnica, intervención o modificación de datos que perjudicara los principios éticos.

VI. Conclusiones

1. Se lograron documentar 8 estudios en total sobre detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el mundo, realizados en Argentina (1), USA (2), Holanda (1), España (2), Francia (1) e India (1). Estos estudios fueron realizados en aguas residuales tratadas y sin tratar en periodo de tiempo diferentes que iban desde un día de muestreo hasta un periodo de dos semanas.
2. Para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales se emplearon diferentes métodos de recolección de muestra, en la mayoría se hizo uso de métodos manuales y en dos estudios se utilizaron muestreadores automatizados. En cuanto a los métodos se empleó ultracentrifugación, adsorción y precipitación con hidróxido de aluminio, precipitación con polietilenglicol (PEG) y concentración por ultrafiltración. Para la extracción y purificación de ácidos nucleicos se utilizaron los siguientes kits, ARN NucleoSpin, PowerFecal Pro, STARMag 96 x 4, RNeasy Mini Kit, QiAamp Viral RNA Mini Kit y el método con TRIzol-cloroformo. La detección molecular se realizó mediante RT-qPCR, utilizando diferentes genes diana.
3. En todos los estudios las muestras resultaron positivas. En Argentina se detectó ARN de SARS-CoV-2 en todas las muestras, además se cuantificó la concentración relativa de ARN utilizando conjuntos de N1 y N2. En Francia, todas las muestras procesadas dieron positivo para la presencia de genomas de SARS-CoV-2. En España, las muestras se consideraron positivas para Ct por debajo de 40. En USA, las muestras recolectadas dieron positivas para SARS-CoV-2, aunque las concentraciones de ARN viral disminuyeron constantemente y luego cayeron por debajo del límite de detección. En India, las muestras fueron positivas con todos los genes orf1ab, de proteína N y de proteína S. En los diferentes estudios documentados el Ct utilizado varía entre 32 a 40 con medidas de 33 y 38 en cada uno de ellos, correspondiente a un rango de copias entre 10^5 y 10^6 copias/L. La identificación de SARS-CoV-2 se llevó a cabo mediante una región diana conservada de los genes ORF1ab, RdRP, gen N, gen E Y gen S.

4. Los estudios documentados en esa investigación no indican la existencia de riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales, aunque si se lograron detectar restos del virus, no se ha logrado demostrar que estas sean infectantes, de modo que existe una polémica ya que las aguas residuales deben tratarse en depuradoras centralizadas adecuadamente diseñadas y gestionadas, ya que cada etapa de tratamiento (así como el tiempo de permanencia y la dilución) de manera que se supone una reducción adicional del riesgo.

5. La vigilancia basada en aguas residuales es un enfoque prometedor para el monitoreo proactivo de brotes. El SARS-CoV-2 se vierte en las heces al principio del curso clínico, lo que lo convierte en un objetivo ideal para el monitoreo basado en aguas residuales, esto funciona como un sistema de alerta temprana para tomar medidas de salud pública antes de la aparición generalizada de la enfermedad. En muchos países a nivel mundial realizan un potencial monitoreo y control del virus en la población, así como para el empleo de la vigilancia epidemiológica en aguas residuales y la implementación de métodos preventivos para el contagio. Es necesario seguir investigando y crear capacidades en relación con los métodos analíticos, la elaboración de modelos, la interpretación de los datos para fundamentar la adopción de decisiones y las medidas de salud pública.

VII. Bibliografía

- Aguilar, N., & Hernández, A. (2020). Características del SARS-CoV-2 y sus mecanismos de transmisión. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(3), 143-148.
- Alcami, p. J. (2020). *INFORMES CIENTÍFICOS COVID-19*. Madrid: Instituto de Salud Carlos III.
- Balboa, S., Iglesias, M., Rodriguez, S., & Martinez, L. (2020). THE FATE OF SARS-COV-2 IN WWTPS POINTS OUT THE SLUDGE LINE AS A SUITABLE SPOT FOR MONITORING. *medRxiv*, 1-24.
- Barreto, S. (10 de 08 de 2020). COVID-19 y aguas residuales. *Revista Cubana de Medicina Tropical.*, 72(3), 1-15. Obtenido de <https://orcid.org/0000-0002-2471-7263>
- Díaz, F., & Toro, A. (2020). SARS-CoV-2/COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Medicina & Laboratorio*, 24(3), 183-205.
- Iglesias, N., Gebhard, L., Carballeda, J., Aiello, I., & Recalde, E. (2021). Vigilancia del SARS-CoV-2 en aguas residuales no tratadas: detección de ARN viral en una comunidad de bajos recursos en Buenos Aires, Argentina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1-6.
- Kumar, M., Kumar, A., Shah, A., Raval, J., & Rajpara, N. (2020). First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *ELSEVIER*, 1-7.
- Lam, E., Leon, A., Leon, K., Llamo, G., & R, L. (2021). BASES MOLECULARES DE LA PATOGÉNESIS DE COVID-19 Y ESTUDIOS IN SILICO DE POSIBLES TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS. *Facultad de Medicina Humana URP*, 417-432.
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., & Italiaander, R. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters*, 1-6.

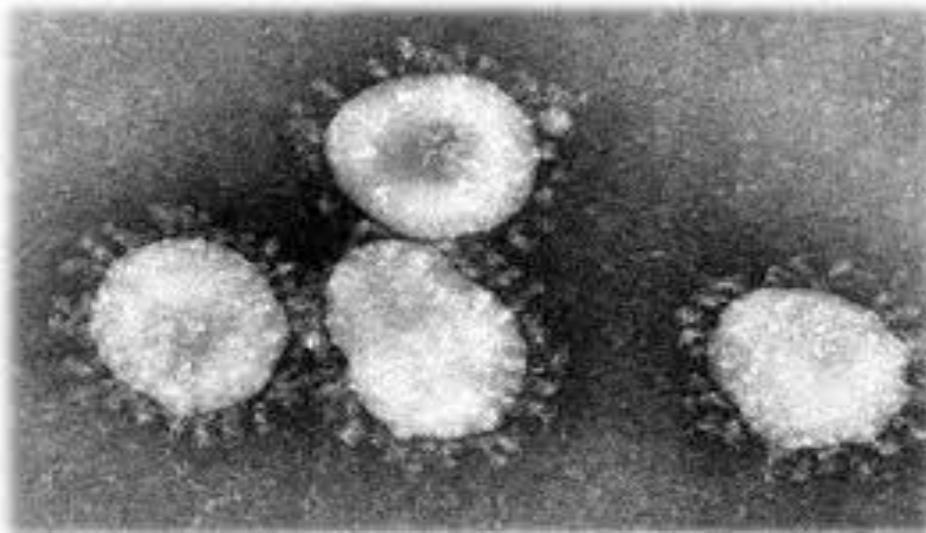
- Nemudryi, A., Nemudraia, A., Wiegand, T., Surya, K., & Buyukyoruk, M. (2020). Detección temporal y evaluación filogenética del SARS-CoV-2 en aguas residuales municipales. *CellPress*, 1-11.
- Oliva, M. J. (2020). SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta*, 3(2), 79-86. doi:<https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- OMS. (2020). *Transmisión del SARS-CoV-2: repercusiones sobre las precauciones en materia de prevención de infecciones*. Organización Mundial de la Salud. Obtenido de WHO/2019-nCoV/Sci_Brief/Transmission_modes/2020.
- OMS; UNICEF. (2020). *Agua, saneamiento, higiene y gestión de desechos en relación con el SARS-CoV-2, el virus causante de la COVID-19*. Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Obtenido de WHO/2019-nCoV/IPC_WASH/2020.4
- Peña, B., & Rincón, B. (2020). Generalidades de la pandemia por COVID-19 y su asociación genética. *Salud UIS*, 52(2), 83-86. doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v52n2-2020001>
- Randazzo, W., Truchado, P., Sanchez, G., & Allende, A. (11 de Mayo de 2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *ELSEVIER*, 1-8.
- Ruiz, A., & Jiménez, M. (30 de 03 de 2020). SARS-CoV-2 y pandemia de síndrome respiratorio agudo (COVID-19). *Ars Pharm*, 61(2), 63-79.
- Santos, G., Cortés, P., Vallejo, V., & Reyes, J. (2021). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta Médica de México*, 88-93.
- Tamay, L., Ibarra, c., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*, 2(2), 70-78.
- Tejadas, C., Villabona, A., & Garces, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*, 18(34), 109-123.

Wu, F., Zhang, J., Xiao, A., Gu, X., & Lee, W. (2020). Los títulos de SARS-CoV-2 en aguas residuales son más altos de lo esperado de los casos clínicamente confirmados. *mSystems*, 1-9.

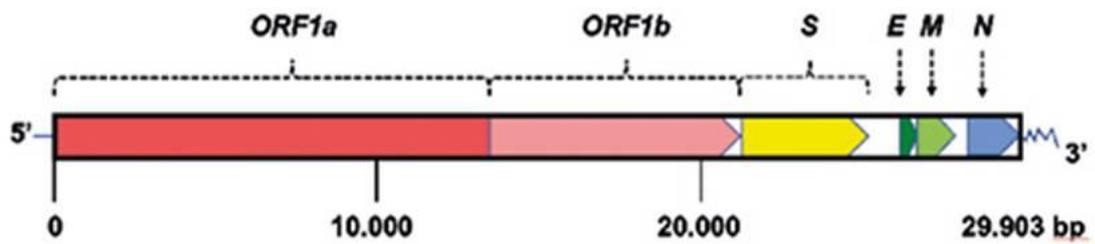
Wurtzer, S., Marechal, V., Mouche, J., & Maday, Y. (2020). Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020. *Eurosurveillance*.

VIII. Anexos

Anexo 1. Microfotografía del virión. Fuente: (Díaz & Toro, 2020)



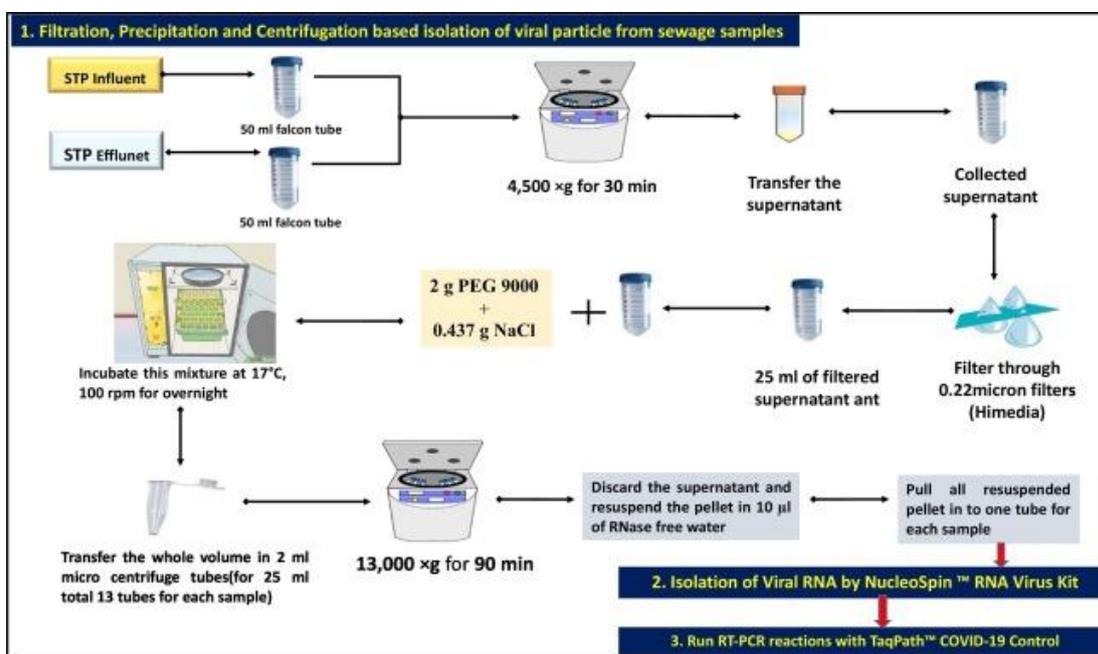
Anexo 2. Genoma del SARS-CoV-2. Fuente: (Ruiz & Jiménez, 2020)



Anexo 3. Esquema conceptual para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales. Fuente: (Barreto, 2020)



Anexo 1. Diagrama de flujo ilustrativo de la precipitación de polietilenglicol modificado (PEG) seguido de aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Fuente: (Kumar et al, 2020)



Anexo 5. Vigilancia epidemiológica de la COVID-19 por aguas residuales SARS-CoV-2 RT-qPCR en seis municipios. Fuente: (Randazzo et al, 2020)

