

COVID-19

Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales

Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales

Washington, D.C., 2021

OPS



Organización
Panamericana
de la Salud



Organización
Mundial de la Salud
OFICINA REGIONAL PARA LAS
Américas

CONÓCELO. PREPÁRATE. ACTÚA.

www.paho.org/coronavirus

Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales

OPS/CDE/CE/COVID-19/21-0014

© Organización Panamericana de la Salud, 2021

Algunos derechos reservados. Esta obra está disponible en virtud de la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Organizaciones intergubernamentales de Creative Commons (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/deed.es>).

Con arreglo a las condiciones de la licencia, se permite copiar, redistribuir y adaptar la obra con fines no comerciales, siempre que se utilice la misma licencia o una licencia equivalente de Creative Commons y se cite correctamente. En ningún uso que se haga de esta obra debe darse a entender que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) respalda una organización, producto o servicio específicos. No está permitido utilizar el logotipo de la OPS.

La OPS ha adoptado todas las precauciones razonables para verificar la información que figura en la presente publicación. No obstante, el material publicado se distribuye sin garantía de ningún tipo, ni explícita ni implícita. El lector es responsable de la interpretación y el uso que haga de ese material, y en ningún caso la OPS podrá ser considerada responsable de daño alguno causado por su utilización.

El uso de nombres específicos de reactivos o equipos de laboratorio no implican ningún compromiso de la OPS con los fabricantes o vendedores de dichos insumos, solo se han incluido como una orientación para facilitar la realización de las pruebas en los laboratorios.

Índice

Agradecimientos	vi
Siglas	vii
1. Introducción	1
2. Consideraciones generales	3
3. Recolección de la muestra	4
3.1. Sitios de recolección de las muestras de aguas residuales.....	4
3.1.1. Muestras de alcantarillado	4
3.1.2. Afluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales	4
3.1.3. Efluentes de sistemas de recolección de aguas residuales de edificios	5
3.1.4. Aguas superficiales que reciben vertimientos de aguas residuales no tratadas.....	5
3.2. Frecuencia de la recolección de muestras	5
3.2.1. Vigilancia comunitaria en aguas residuales	5
3.2.2. Recolección de muestras de efluentes de establecimientos con poblaciones vulnerables.....	6
3.3. Metodología para la recolección de muestras.....	6
3.3.1. Recolección manual de muestras	6
3.3.2. Recolección de muestras con un equipo de muestreo automático	7
3.3.3. Muestra simple	7
3.3.4. Muestra compuesta	8
3.3.5. Parámetros físicos y químicos que se toman en cuenta para la medición	8
3.3.6. Transporte de las muestras	9
3.3.7. Almacenamiento de las muestras.....	9
4. Métodos de concentración viral	10
4.1. Método de filtración utilizando membranas	12
4.1.1. Equipos y reactivos	12
4.1.2. Procedimiento.....	13
4.2. Ultrafiltración	14
4.2.1. Equipos y reactivos	14

4.2.2.	Procedimiento.....	15
4.3.	Ultracentrifugación	16
4.3.1.	Equipos y reactivos	16
4.3.2.	Procedimiento.....	17
4.4.	Precipitación con polietilenglicol	18
4.4.1.	Equipos y reactivos	18
4.4.2.	Procedimiento.....	19
5.	Purificación del ácido ribonucleico.....	20
6.	Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción inversa.....	21
6.1.	Consideraciones generales.....	21
6.2.	Equipo y reactivos	22
6.3.	Materiales	23
6.3.1.	Área 1.....	23
6.3.2.	Área 2.....	24
6.4.	Procedimiento.....	24
6.4.1.	Prueba.....	24
6.4.2.	Preparación de un control positivo cuantificable.....	25
6.4.3.	Preparación de la solución patrón de plasmidios que contengan las secuencias de las dianas que se amplificarán en la reacción de qPCR	25
6.5.	Preparación de una curva estándar de 5 puntos.....	26
6.5.1.	Procedimiento.....	26
6.6.	Criterios de interpretación, y cálculo y expresión de los resultados.....	27
6.6.1.	Criterios de interpretación.....	27
6.6.2.	Cálculo de la concentración viral de SARS-CoV-2	27
7.	Control y aseguramiento de la calidad	30
7.1.	Control positivo	30
7.2.	Control negativo.....	30
7.3.	Control blanco	31
7.4.	Prueba de inhibición de la muestra	31
7.5.	Pruebas de recuperación	31

7.6. Controles endógenos	33
7.7. Participación en pruebas interlaboratorio	35
7.8. Límites de detección y cuantificación	35
7.8.1. Límite de detección.....	35
7.8.2. Límite de cuantificación	35
7.9. Otras pruebas de control de calidad	35
8. Condiciones de bioseguridad.....	37
8.1. Recolección de muestras de agua residual	37
8.2. Procedimientos de laboratorio	38
8.3. Envío y transporte de muestras	39
Referencias.....	40
Anexo 1. Diseño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción inversa para la detección del coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo grave.....	47
Anexo 2. Diseño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción inversa para la detección del virus respiratorio sincitial bovino (BSRV)	48
Anexo 3. Diseño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción del fago de ensamblaje cruzado del virus(crAss-fago)	50
Anexo 4. Diseño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para la detección del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV)	52
Anexo 5. Preparación de reactivos	54

Agradecimientos

Esta publicación se elaboró bajo la coordinación de la Unidad de Cambio Climático y Determinantes Ambientales de la Salud (CE) del Departamento de Enfermedades Transmisibles y Determinantes Ambientales de la Salud (CDE) de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), con la colaboración de la Unidad de Inmunización Integral de la Familia (IM) del Departamento de Familia, Promoción de la Salud y Curso de Vida (FPL), también de la OPS.

La coordinación técnica estuvo a cargo de Patricia Segurado (Equipo Técnico Regional sobre Agua y Saneamiento, CDE/CE), Agnes Soares da Silva (CDE/CE), Sally Edwards (CDE/CE) y Gloria Rey-Benito (FPL/IM).

La OPS agradece el invaluable compromiso y colaboración durante su elaboración al grupo impulsor de la vigilancia ambiental en aguas residuales del coronavirus de tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2, por su sigla en inglés), compuesto por los miembros siguientes:

- Andrei Badilla, del Laboratorio Nacional de Aguas, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, Tres Ríos, Cartago (Costa Rica).
- Jorge Olvares, del Grupo de Resistencia a los Antibióticos en Bacterias Patógenas y Ambientales, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile).
- Marizé Pereira, del Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundación Oswaldo Cruz, Río de Janeiro (Brasil).
- Maria Ines Sato, de la Compañía Ambiental del Estado de San Pablo (CETESB), San Pablo (Brasil).

De manera especial se reconoce a María Luisa Esparza, exfuncionaria del Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente de la OPS y a Marco Quintela de la Universidad de Newcastle (Reino Unido), quienes participaron en las reuniones técnicas con el grupo impulsor, así como a los investigadores de los países participantes de Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, España, Estados Unidos de América, Honduras, México, Paraguay, Perú y Uruguay, que aportaron información de sus laboratorios, compartieron sus experiencias y ayudaron en la definición de las orientaciones y los contenidos de esta publicación.

Siglas

ARN	ácido ribonucleico
ADN	ácido desoxiribonucleico
BRSV	virus respiratorio sincitial bovino
BSL	nivel de bioseguridad
COVID-19	enfermedad por el coronavirus 2019
crAss-fago	fago de ensamblaje cruzado
Ct	umbral de ciclo
EPP	equipo de protección personal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	tampón fosfato salino
PEG	polietilenglicol
phiØ6	fago de <i>Pseudomonas</i>
PMMoV	virus moteado suave del pimiento
RT-qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa
SARS-CoV-2	coronavirus de tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave

1. Introducción

La detección del coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2, por su sigla en inglés) en las heces y su posible excreción temprana con respecto al inicio de los síntomas en las vías respiratorias (1) permite elaborar una estrategia llamada *epidemiología basada en aguas residuales* (EBAR) (2). Esta herramienta es un recurso adicional para apoyar las acciones de prevención y control de la enfermedad por el coronavirus de 2019 (COVID-19, por su sigla en inglés) en varias regiones del mundo (3-7). La EBAR consiste en el análisis de patógenos en la red del alcantarillado y plantas de tratamiento de aguas residuales. Esto permite obtener datos sobre la circulación de estos microorganismos en una población y territorio determinados cuando se excretan en las heces y la orina de las personas infectadas (8). De esta manera, se convierte en una herramienta útil, sobre todo donde los recursos para el diagnóstico clínico son limitados y cuando los sistemas de notificación no están disponibles o no son eficientes (9-13).

La mayoría de las estrategias para detectar virus en matrices ambientales constan de tres pasos: *i*) concentración viral; *ii*) purificación de ácidos nucleicos; y *iii*) detección molecular (14). En el apartado 4 (Métodos de concentración viral) se presentan algunos de los protocolos utilizados recientemente para la recuperación del SARS-CoV-2 a partir de muestras de aguas residuales (15). Otros métodos de concentración, y sus ventajas y desventajas, se pueden consultar en una revisión reciente descrita por Patel y cols. (16).

Este enfoque ambiental para rastrear el SARS-CoV-2 se ha utilizado en varios países, como Australia, Brasil, China, España, Estados Unidos de América, Italia, Francia y los Países Bajos, desde el inicio de la pandemia de COVID-19 (3, 5, 8, 11, 13, 17-19). Estos datos también se han utilizado como indicadores complementarios para la aplicación de medidas de control y mitigación de la epidemia de COVID-19. Por otra parte, la vigilancia de las aguas residuales puede servir como alerta temprana de emergencia de variantes virales (20) o detectar la reaparición de la enfermedad en un lugar determinado.

Si bien los primeros hallazgos del SARS-CoV-2 en aguas residuales fueron notificados por laboratorios de investigación de países industrializados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una reseña científica sobre los posibles usos, las consideraciones y la necesidad de investigación en este campo nuevo que, en coordinación con los sistemas de vigilancia de salud pública de la COVID-19, aporte información complementaria para entender la dinámica de la transmisión (21).

Este documento tiene como objetivo establecer las pautas mínimas para aplicar una herramienta de vigilancia epidemiológica en aguas residuales como recurso en la lucha contra la pandemia de COVID-19. Los protocolos propuestos se elaboraron con base en la experiencia de su aplicación en algunos laboratorios de América Latina y podrán ser actualizados a medida que se genere mayor información.

2. Consideraciones generales

Este documento constituye una guía para la detección y la cuantificación del SARS-CoV-2 en matrices de aguas residuales como complemento de la vigilancia epidemiológica realizada por las autoridades sanitarias en un territorio determinado. En esta guía se proporcionan sugerencias basadas en la aplicación de un sistema de cuantificación y detección del SARS-CoV-2 en diferentes laboratorios en América Latina (localizados en Brasil, Chile y Costa Rica), desde la recolección de la muestra hasta el resultado final, incluidos los pasos de concentración de la muestra, la purificación de ácido ribonucleico (ARN), la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR, por su sigla en inglés) y el control de calidad analítico. Esta guía no constituye una normativa para su aplicación, sino que solo reúne sugerencias de criterios para que la técnica sea validada y reproducible, y pueda ser replicada en otros laboratorios. Los laboratorios que participaron en la elaboración de esta guía no se constituyen como laboratorios de referencia de la técnica; sin embargo, se erigen como entidades que pueden ser consultadas para la aplicación de las medidas aquí explicadas en cualquier país que lo requiera y amerite. La Organización Panamericana de la Salud (OPS), junto con el grupo impulsor e investigadores de los países de la Región, desea proporcionar una herramienta efectiva en la lucha contra la pandemia, con base en información fiable, comparable y con niveles de incertidumbre aceptables, y que contribuya a la toma de decisiones en salud pública para reducir la transmisión de la COVID-19.

3. Recolección de la muestra

La recolección de muestras de las aguas residuales es un tema crítico. La estrategia con respecto a la frecuencia y el tipo de muestra dependerá del objetivo para el cual se realiza la medición. Entre los objetivos para los cuales se recomienda realizar la medición del SARS-CoV-2 se encuentran los siguientes: *i)* vigilancia comunitaria de aguas residuales, para establecer posibles niveles de alerta; *ii)* detección de áreas vulnerables; *iii)* determinación de la carga viral en edificios con poblaciones vulnerables específicas, como residencias de personas mayores o presidios; y *iv)* vigilancia ambiental complementaria de la vigilancia en salud pública. A continuación, se incluyen algunas pautas básicas para el muestreo.

3.1. Sitios de recolección de las muestras de aguas residuales

3.1.1. Muestras de alcantarillado

Este tipo de muestras podría utilizarse para la determinación de áreas vulnerables, vigilancia comunitaria y vigilancia ambiental complementaria, entre otras acciones.

3.1.2. Afluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales

Las plantas de tratamiento de aguas residuales representan puntos estratégicos para evaluar la diseminación de un patógeno excretado en las heces en una comunidad específica. Es importante conocer el número de hogares y de personas que aportan material a las plantas de tratamiento que se desean evaluar, ya que con este dato se podrían establecer modelos para estimar un número probable de infectados. Otro uso de este tipo de fuente es la vigilancia ambiental del virus y la estimación de su carga. Con este dato, la autoridad sanitaria podría ejecutar un plan de detección más enérgico o establecer una estrategia de búsqueda de casos activos no detectados con la vigilancia clínica tradicional. También se puede utilizar como alerta temprana en lugares donde la pandemia aún no está instalada o para detectar una nueva ola de enfermedad por el mismo virus o por alguna de sus variantes.

3.1.3. Efluentes de sistemas de recolección de aguas residuales de edificios

Esto puede ser relevante para detectar brotes específicos en residencias de personas mayores, presidios y edificios de departamentos, entre otros. Permite establecer un control local sobre una población específica para tomar medidas de confinamiento y de respuesta rápida.

3.1.4. Aguas superficiales que reciben vertimientos de aguas residuales no tratadas

Estas matrices de agua pueden ser objeto de monitoreo en países donde el tratamiento de aguas residuales es ineficiente o nulo. En estos casos, los efluentes de aguas residuales van directamente a los ríos o arroyos. Esta masa de agua contaminada puede ser fundamental para determinar la cantidad de virus excretada en aguas superficiales. Se sugiere seguir la misma metodología de recolección de muestras mencionada en el apartado 3.1.2 (Afluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales).

3.2. Frecuencia de la recolección de muestras

Tanto el sitio como la frecuencia de recolección de muestras dependen del o de los motivos por los cuales se realice la cuantificación del virus. Asimismo, dependerá de la capacidad que tenga el laboratorio para el procesamiento de estas muestras según el protocolo utilizado. A continuación, se presentan algunos ejemplos de frecuencia de la recolección de muestras (diaria, semanal, quincenal o mensual) según los alcances del programa de vigilancia.

3.2.1. Vigilancia comunitaria en aguas residuales

La frecuencia de la recolección de muestras estará totalmente supeditada a las necesidades de la autoridad sanitaria para la realización de la vigilancia comunitaria. Cuanto mayor sea la frecuencia, mayor será la eficacia en la detección de la circulación del virus en la población. Algunos países de Europa y de América del Norte han estado trabajando con muestreos diarios; sin embargo, es importante tener en cuenta el costo derivado de un monitoreo continuo. Por lo tanto, y con base en las limitaciones de fondos y personal que existe en algunos países

latinoamericanos, en general se recomienda la recolección de al menos dos muestras por semana.

Uno de los instrumentos que también ha sido utilizado con frecuencia en diversos países es el concepto de semana epidemiológica: por lo tanto, los datos de carga viral también deberían ser estimados cada semana epidemiológica. Para este instrumento en particular, la frecuencia semanal o bisemanal son las más adecuadas.

3.2.2. Recolección de muestras de efluentes de establecimientos con poblaciones vulnerables

Para determinar las condiciones de riesgo de las personas que se encuentran confinadas en establecimientos específicos y dentro de un programa de monitoreo, lo óptimo sería recolectar muestras con una frecuencia semanal o quincenal.

3.3. Metodología para la recolección de muestras

Este punto en particular dependerá de las condiciones del punto de muestreo para la recolección de la muestra. De todas maneras, y en general, el proceso de recolección de muestra se podría clasificar según cómo se obtiene la muestra y el tipo de muestra. La muestra a recolectar puede ser simple o compuesta, y el procedimiento de recolección puede ser manual o automatizado mediante instrumentos diseñados a tal fin.

3.3.1. Recolección manual de muestras

Para este tipo de recolección de muestra, se recomienda que el recipiente sea fácil de manipular para el operador, que sea de un material resistente y que se pueda esterilizar en autoclave para su reutilización. Si no es posible tener un recipiente apto para reutilizar, se recomienda enérgicamente la utilización de recipientes de un solo uso. Si bien el volumen de la muestra dependerá del tipo de concentración que se realiza, se sugiere el uso de botellas plásticas de uno o dos litros de capacidad y de boca ancha aptas para su esterilización en autoclave. Se recomienda recolectar la muestra de agua en un balde de acero inoxidable esterilizado y luego verterla en las botellas. Si se tiene acceso a un grifo de donde se pueda

recolectar el agua residual (p. ej., en la planta de tratamiento de aguas) se recomienda su uso para evitar cualquier inconveniente para el operador. Si se planifica congelar la muestra, se sugiere llenar la botella a solo tres cuartos de su capacidad. Se recomienda rotular cada muestra obtenida con el nombre del sitio de muestreo, la fecha y hora de obtención, las iniciales de la persona responsable de su obtención e indicar en el registro si la muestra presenta alguna observación o condición particular. Se recomienda mantener una cadena de frío hasta que la muestra llegue al laboratorio.

3.3.2. Recolección de muestras con un equipo de muestreo automático

En la actualidad, existen en el mercado varias alternativas de dispositivos automáticos para la recolección de muestras, los cuales podrían ser colocados en un punto de la red del alcantarillado, como el afluente de una planta de tratamiento. Estos dispositivos automáticos eliminan el error humano de la recolección y permiten recolectar muestras compuestas de una manera más precisa y cómoda. El uso de estos equipos dependerá totalmente de la disponibilidad de recursos con los que se cuente. Se recomienda rotular cada muestra con el nombre del sitio de muestreo, la fecha y hora de obtención, y las iniciales de la persona responsable de su obtención. Cualquier información relevante del entorno del punto de recolección de la muestra debe quedar anotada en el registro de la persona que recoge la muestra.

3.3.3. Muestra simple

En este caso, se recolecta una muestra por única vez a una hora determinada del día. La muestra se puede obtener en forma manual o mediante un dispositivo automático. Si bien las muestras simples no son del todo representativas de las aguas residuales en el ciclo diario, se pueden obtener con una frecuencia semanal dentro de un programa de vigilancia ambiental, siempre y cuando se tome la muestra el mismo día de la semana a una misma hora, de preferencia en la hora que se presenta el pico más alto de afluencia de heces al alcantarillado. Una alternativa es establecer la hora del caudal promedio del efluente que sea representativo

del día. Para determinar este momento, se requiere estudiar el alcantarillado con respecto a parámetros microbiológicos como las concentraciones de virus endógenos como el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV, por su sigla en inglés), el fago de ensamblaje cruzado (crAss-fago, por su sigla en inglés) o las concentraciones de la bacteria *Escherichia coli*. La hora de mayor afluencia también se puede deducir utilizando parámetros químicos como la presencia de amonio, la demanda biológica de oxígeno (DBO) o la concentración de cafeína.

3.3.4. Muestra compuesta

En este caso, se recogen volúmenes determinados de la matriz de agua residual, por lo general con frecuencia diaria. Las muestras compuestas pueden prepararse a partir de muestras simples recolectadas en una hora, otros períodos de tiempo y hasta en 24 horas, de hora en hora. Este último tipo de muestra es el más completo y representativo de la presencia de patógenos que circulan en las aguas residuales. Lo ideal sería que las muestras compuestas a partir de varias muestras simples durante un ciclo de 24 horas sean proporcionales a los caudales, pero cuando estos no se pueden medir, se podría estimar a partir de la experiencia de la información aproximada de los caudales horarios que tienen los organismos de los servicios de saneamiento.

3.3.5. Parámetros físicos y químicos que se toman en cuenta para la medición

Se recomienda la determinación de los siguientes parámetros físicos y químicos en el procedimiento de recolección de muestras: el caudal, el pH, la temperatura, los índices de lluvia, los compuestos sólidos disueltos, la concentración de amonio, la turbidez y la conductividad. También podrían ser de interés la presencia de compuestos sólidos suspendidos, la DBO y la demanda química de oxígeno. Estas dos últimas se asocian con valores de carga orgánica.

3.3.6. Transporte de las muestras

Las muestras deben ser transportadas hasta el laboratorio manteniendo una cadena de frío (2 °C a 8 °C). Para ello, es necesario utilizar un recipiente de tipo nevera acondicionado con hielo o bien con elementos que permitan mantener una temperatura baja en todo el trayecto. Se sugiere el uso de elementos del tipo gel frío hasta que las muestras lleguen al laboratorio.

3.3.7. Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben mantenerse refrigeradas (2 °C a 8 °C) desde el momento de la recolección y, si es posible, deben ser procesadas dentro de las 24 horas siguientes, con el fin de reducir la degradación del ARN del SARS-CoV-2. Si no puede procesar la muestra dentro de las 24 horas posteriores a la recolección, se debe agregar un control de recuperación de matriz (p. ej., PMMoV) antes de refrigerarla a 2 °C a 8 °C o congelarla a -20 °C o -80 °C¹. Por otra parte, estudios recientes precisan que las muestras se pueden conservar en el refrigerador (2 °C a 8 °C) hasta por una semana (5).

Si se cuenta con un congelador de -80 °C, las muestras deberían guardarse allí hasta su procesamiento, durante un tiempo límite de hasta tres o cuatro meses. Sin embargo, también cabe la posibilidad de guardar las muestras en un congelador convencional de -18 °C para luego procesarlas hasta en un período máximo de tres semanas. Para su procesamiento, se deben descongelar las muestras en forma gradual a temperatura ambiente (25 °C), sin acelerar nunca el proceso de descongelación. Se recomienda no realizar más de un proceso de congelación y descongelación para cada muestra.

¹ Para información más detallada, puede consultar en: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Métodos de análisis de vigilancia de aguas residuales. Atlanta: CDC; 2020. Disponible en <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/wastewater-surveillance/testing-methods.html>.

4. Métodos de concentración viral

Uno de los principales desafíos al establecer el monitoreo del SARS-CoV-2 en las aguas residuales ha sido la selección de métodos para determinar la concentración del virus en las muestras, ya que la mayoría de los métodos para medir la concentración viral en aguas residuales se desarrollaron y validaron para virus sin envoltura. Hasta la fecha, se ha evaluado la eficiencia de varios métodos para la recuperación de SARS-CoV-2 en estas muestras. Estos protocolos deben llevarse a cabo en condiciones de nivel de bioseguridad 2 (BSL2, por su sigla en inglés). Esto es, dentro de un gabinete BSL2, con protección individual adecuada, incluidas las gafas de protección. Los rotores de la centrifuga deben ser abiertos en el gabinete y se desinfectan después de cada uso.

Junto con las muestras para concentrar se debe analizar una muestra de agua destilada estéril como control (llamado control blanco), de la misma forma que una muestra normal. Al final del proceso, se espera que el control blanco tenga resultados no detectables en todos los análisis que se realicen.

Además del control negativo, se debe realizar un control exógeno (con BRSV o con fago de *Pseudomonas* [$\phi\text{Ø}6$]) para evaluar la recuperación del método, así como un control endógeno (con PMMoV o crAss-fago) para normalizar los resultados en la aplicación del modelado de datos. Estos procedimientos se presentan en el capítulo 7 (Control y aseguramiento de la calidad).

Antes de la concentración, se pueden pasteurizar las muestras de aguas residuales a 60 °C durante 90 minutos para inactivar los virus, como describen Wu *et al.* (22). Este procedimiento es totalmente opcional. Esta inactivación está dirigida a otros patógenos presentes en el agua residual. Se desconoce hasta qué punto la pasteurización por calor dañará los fragmentos cortos de ARN objetivo de la PCR en las aguas residuales. Por último, está demostrado que la probabilidad de contagio con el virus SARS-CoV-2 desde matrices de aguas residuales es muy

baja;, por lo tanto, un laboratorio con BSL2 sería suficiente para minimizar la probabilidad de una exposición accidental al virus (23).

A continuación, se mencionan algunos de los protocolos de concentración viral disponibles en la literatura y utilizados para la concentración de SARS-CoV-2 en aguas residuales (15):

- Ultracentrifugación (24).
- Ultracentrifugación a 200 000 x g por 1 h a 4 °C (13).
- Ultracentrifugación a 200 000 x g por 1 h a 4 °C, precipitación con polietilenglicol (PEG) y centrifugación a 12 000 x g durante 2 h hasta que el sedimento sea visible (22).
- Método A: extracción directa de ARN de un filtro electronegativo de 0,45 µm (90 mm de diámetro) (25).
- Método B: centrifugación a 4745 x g durante 30 min. El sobrenadante se centrifugó a 3500 g durante 15 min a través de un filtro centrífugo con un corte de 10 kDa (26).
- Centrifugación a 4654 g durante 30 min para eliminar partículas grandes (células y desechos). El sobrenadante se filtró con ultrafiltración centrífuga con un corte de 10 kDa a 1500 g durante 15 min (3).
- Adaptación del protocolo estandarizado de la OMS (17, 27):
 - Centrifugación inicial de aguas residuales para sedimentar los sólidos.
 - Mezclar las aguas residuales clarificadas con dextrano y PEG y mantener durante la noche a 4 °C en un embudo de decantación.
 - El concentrado se añadió a la microesfera de sedimento.
 - Se ha omitido el tratamiento con cloroformo para preservar la integridad de los virus con envoltura.
- Adsorción y precipitación con hidróxido de aluminio: una parte de solución de cloruro de aluminio 0,9 N para 100 partes de muestra, incubación durante 15 min a temperatura ambiente con un agitador orbital. Centrifugación a 1700 x g durante 20 min (19).

- Resuspensión de la microesfera de sedimento en extracto de carne y centrifugación a 1900 x g durante 30 min. Resuspensión de microesferas de sedimento en tampón fostato salino (PBS) (19).
- Floculación con leche descremada. Incubación de 8 h en una solución de agua de mar artificial + 1% de leche descremada y un pH de 3,5 (28).
- Centrifugación a 8000 x g por 40 min. Resuspensión de microesferas de sedimento en PBS (28).

Durante la elaboración de este protocolo mínimo, se seleccionaron cuatro métodos diferentes para la concentración de SARS-CoV-2, que se encuentran entre los más notificados en la bibliografía especializada, y que han sido utilizados por los laboratorios participantes en el grupo impulsor.

4.1. Método de filtración utilizando membranas²

Si el agua residual que se analizará tiene contenido elevado de agua de lluvia, se recomienda utilizar un volumen mayor para la concentración viral (hasta 500 mL). Se debe tener claro que, cuanto mayor es el volumen de la muestra, mayor es la probabilidad de concentrar inhibidores. Es ideal que cada laboratorio conozca la posible influencia de inhibidores en su procedimiento analítico.

4.1.1. Equipos y reactivos

- Colector de embudos de acero inoxidable o embudos descartables.
- Bomba de vacío.
- Membranas de ésteres de nitrocelulosa de 0,45 µm.
- Cloruro de magnesio (MgCl₂) 2,5 M.
- Ácido clorídrico (HCl) 1N.

² El laboratorio impulsor de este método fue el Laboratorio Nacional de Aguas, perteneciente al Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Para más información, véase: <https://www.aya.go.cr/cooperacion/Paginas/default.aspx>.

- Centrífuga de mesa con capacidad de centrifugar al menos a 4000 x g.
- Micropipetas (de 10, 100 y 1000 μ L).
- Pinzas estériles.

4.1.2. Procedimiento

- Preparar un volumen específico de agua residual, de entre 50 y 500 mL. Asegurarse de medir el volumen con una probeta o algún instrumento de medición, con el fin de realizar la adición correcta de cloruro de manesio ($MgCl_2$).
- Agregar 1 mL de una solución de $MgCl_2$ 2,5 M por cada 100 mL de agua residual, o su equivalente para alcanzar una concentración final de 25 mM de $MgCl_2$.

Opcional: ajustar a pH 3 el volume de agua residual utilizando ácido clorhídrico (HCl) 1N.

- Incubar por 30 min el volumen de agua residual inoculado con el virus utilizado para los ensayos de recuperación.

Nota: para mejorar el contacto de las partículas virales con el medio, se sugiere realizar la incubación con agitación lenta y controlada utilizando un agitador orbital.

- Filtrar la muestra de agua residual a través de una membrana de ésteres de nitrocelulosa de 0,45 μ m, de 47 o 90 mm de diámetro utilizando embudos de plástico descartables o de acero inoxidable.
- Después de filtrar, levantar la membrana de la frita o base del sistema de filtración con dos juegos de pinzas estériles y enrollar el filtro en forma de cilindro, dejando la parte superior (la que tuvo contacto directo con el agua) hacia adentro. *Nota:* no enrollar ni doblar la membrana con fuerza ya que puede causar degradación del ARN³.

³ Se puede ver este paso en el siguiente video de MO BIO Laboratories (en inglés): [Filter Membrane Insertion into Bead Tube.](#)

- Insertar el filtro enrollado (cilindro) en un tubo de microcentrifuga estéril de 2 mL (extracción de ARN con perlas o microesferas), o bien en tubos de homogeneización de 5 mL (extracción de ARN con el kit).

4.2. Ultrafiltración⁴

En este protocolo se concentra el virus SARS-CoV-2 desde 70 mL de aguas residuales a un volumen final de 200-300 µl, utilizando un filtro de ultrafiltración para centrífuga Centricon® Plus-70.

4.2.1. Equipos y reactivos

- Balanza.
- Agua destilada estéril (70 mL por muestra).
- Pipetas estériles y dispensador de volumen automático.
- Puntas con filtro y micropipetas (100-1000 µL).
- Para el pretratamiento de las muestras se utilizan:
 - Centrífuga de alta velocidad (4750 x g) con un rotor de ángulo fijo (se deben centrifugar 70 mL por muestra).
 - Tubos de centrífuga de alta velocidad estériles.

Para la ultrafiltración de las muestras se utilizan:

- Centrífuga (3000 x g) con rotor basculante con capacidad para botellas de 250 mL.
- Filtro de centrifugación Centricon® Plus-70 (valor de corte de filtro de 10 o 30 KDa).
- Una unidad de Centricon® por cada 70 mL de muestra.

⁴ El laboratorio impulsor de este método es la Compañía Ambiental del Estado de San Pablo (CETESB) (Brasil). Para más información, véase: <https://cetesb.sp.gov.br/>.

4.2.2. Procedimiento

Enjuague de las membranas del Centricon Plus-70®

Colocar el sistema de filtración en un tubo apropiado y taparlo.

Se debe recordar que las membranas contienen trazas de glicerina, que se utiliza como humectante. Para eliminar la glicerina en el enjuague previo, llenar la parte del filtro con 70 ml de agua Milli-Q®, centrifugar hasta 3000 x g durante 15 minutos y volver a colocar el filtro y el recipiente colector.

ATENCIÓN: una vez mojada la membrana en el dispositivo de filtrado no permitir que se seque. Si el dispositivo no se usa inmediatamente después del enjuague previo, dejar líquido en la membrana hasta que se use el dispositivo.

Concentración de la muestra

- Agregar el sobrenadante de la muestra a la taza del filtro y tapar.
- Centrifugar a 3000 x g durante 30 min. En caso de que quede algo de muestra sin filtrar en la copa del filtro, retirarla con una micropipeta.

PRECAUCIÓN: equilibrar siempre la centrífuga con un segundo tubo que contenga un dispositivo Centricon Plus-70® y un volumen igual de muestra o agua. Si la cantidad de concentrado que queda en el recipiente de filtración y la muestra está por encima de la parte superior del centro del filtro, eliminar la cantidad de material sobrante en un recipiente adecuado antes de continuar.

Recuperación del concentrado

- Voltear el recipiente de filtración boca abajo y colocarlo encima del tubo del filtro de muestra. Invertir el dispositivo con cuidado y colocarlo en la centrífuga. Proceder a centrifugar a 1000 x g durante 3 minutos.
- Retirar el recipiente de concentración que contiene la muestra concentrada del recipiente de filtración. Mantener el recipiente de filtración invertido durante este proceso. Retirar la muestra con una pipeta y almacenar (aproximadamente 200 µl) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a -80 °C.

4.3. Ultracentrifugación⁵

A continuación, se describe el método de concentración viral de muestras de aguas residuales con base en la densidad relativamente alta de los virus, que permite la concentración de estos con el método de ultracentrifugación (24).

4.3.1. Equipos y reactivos

- Agitador orbital.
- Agitador magnético.
- Balanza analítica.
- Medidor de pH de mesa.
- Ultracentrífuga.
- Tubos para ultracentrífuga.
- Guantes de procedimiento desechables.
- Micropipetas de 1000 µL (monocanal).
- Microtubos nuevos y estériles de 1,5 mL.
- Pipetas estériles de 10 mL y 25 mL.

⁵ Los laboratorios impulsores de este método fueron el CETESB y la Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Brasil).

- Recipiente de baño de hielo.
- Puntas protegidas nuevas y esterilizadas para pipetas de 1000 μ L.
- Recipiente con solución de hipoclorito de sodio al 3%.
- Recipiente de plástico para eliminación y esterilización en autoclave.
- Recipiente de plástico para la eliminación de reactivos.
- Tampón de glicina 0,25 N pH 9,5.
- PBS 2 \times y 1 \times .

4.3.2. Procedimiento

- Colocar 42 mL de la muestra en un tubo de centrifuga apropiado.
- Centrifugar a 110 000 x g durante una hora a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 4 mL de glicina 0,25 N a pH 9,5. Colocar el sedimento resuspendido en glicina en un tubo. Incubar con hielo en el agitador durante 30 minutos, agitar cada 5 minutos.
- Agregar 4 mL de PBS 2 \times frío.
- Centrifugar durante 20 minutos a 3000 x g.
- Recoger el sobrenadante (aproximadamente 8 mL) y colocarlo en un tubo de centrifuga apropiado.
- Equilibrar con PBS 1 \times y centrifugar a 110 000 x g durante una hora a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante.
- Eluir el sedimento con un volumen de 100-500 μ L de PBS 1 \times . Tener en cuenta el volumen final de concentrado. Conservar a -70 C.

4.4. Precipitación con polietilenglicol ⁶

El protocolo consiste en la utilización del PEG para la precipitación de las partículas del SARS-CoV-2.

4.4.1. Equipos y reactivos

- Centrífuga refrigerada para varios volúmenes, con la posibilidad de centrifugar hasta 500 mL.
- Tubos de centrífuga adecuados para el volumen de proceso.
- Agitador magnético.
- Baño ultrasónico.
- Extracto de carne.
- Glicina.
- PEG 6000 o PEG 8000.
- Cloruro de sodio.
- PBS.
- Balanza analítica.
- Medidor de pH de mesa.
- Guantes de procedimiento desechables.
- Micropipetas de 200 y 1000 uL.
- Microtubos nuevos y estériles de 1,5 mL.
- Pipetas estériles de 10 y 25 mL.
- Recipiente con solución de hipoclorito de sodio al 3%.
- Recipiente de plástico para la eliminación y la esterilización en autoclave.
- Recipiente de plástico para la eliminación de reactivos.

⁶ Los laboratorios impulsores de este método son el Grupo de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Patógenas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Universidad Andrés Bello de Santiago de Chile (Chile).

- Tampón pretratamiento 1: solución de glicina 0,05M y extracto de carne al 3% (pH 9,6). Para su preparación, añadir 1,88 g de glicina y 15 g de extracto de carne en agua destilada. Ajustar a pH 9,6 utilizando hidróxido de sodio.

4.4.2. Procedimiento

- Tomar un volumen entre 50 y 500 mL de aguas residuales
- Centrifugar las muestras a 10 000 x g durante 30 min a temperatura ambiente
- Resuspender la microesfera de sedimento en 100 mL de tampón pretratamiento 1 e incubar en agitación (100 revoluciones por minuto [rpm]) durante 30 min a temperatura ambiente.

Nota: no descartar el sobrenadante y guardarlo.

- Centrifugar la resuspensión a 10 000 x g durante 30 min a una temperatura de 4 °C y recolectar el sobrenadante.
- Mezclar los sobrenadantes provenientes de los pasos anteriores, añadir 80 g/L de PEG 8000 (o PEG 6000) y 17,5 g/L de NaCl₂ directamente sobre la solución líquida.
- Incubar durante toda la noche a 4 °C con agitación (100 rpm, aproximadamente).
- Centrifugar a 10 000 x g por 1 hora a 4 °C.
- La microesfera de sedimento que contiene las partículas virales puede ser resuspendido en 500 µL de PBS y guardado a -20 °C (se recomienda a -80 °C).

5. Purificación del ácido ribonucleico

Luego de obtener la muestra concentrada, el siguiente paso en el proceso consiste en extraer los ácidos nucleicos. En la bibliografía especializada reciente 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 aislamiento de ARN descritos en la bibliografía y los utilizados por este grupo impulsor:

- RNeasy PowerMicrobe (Qiagen y Biomerieux Nulisens) Kit (Biomerieux) en combinación con extractor semiautomatizado KingFisher (Thermo Scientific) (3, 29).
- Trizol (ThermoFisher) (22).
- RNeasy Mini Kit (Qiagen) (4).
- RNeasy Power Water Kit; RNeasy Power Microbiome (Qiagen) (2, 5). Se utiliza en el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (Costa Rica).
- PowerFecal Pro kit con un extractor automático QIASymphony (Qiagen) (13).
- Kit de detección de ácido nucleico en SARS-CoV-2 (Shanghai Berger Medical Technology Co., China) (30).
- Kit para virus ARN Nucleospin (Macherey-Nagel) (19).
- Sistema de extracción semiautomático NucliSENS miniMAG (bioMerieux) (17).
- Mini kit para virus ARN QIAamp (Qiagen) (18, 31). Se utiliza en la Compañía Ambiental del Estado de San Pablo (CETESB) (Brasil).
- Mini kit RNeasy (Qiagen), EasyMAG (bioMerieux) (32).
- Mini kit EZ1 virus (Qiagen) (33).
- Kit FastRNA Pro Blue (MP Biomedicals) (34).
- Quick-RNA Fecal/Soil Microprep (Zymo Research).
- Trizol + kit I.E.Z.N.A ARN total (Omega Bio Tek). Se utiliza en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile).

6. Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción inversa

6.1. Consideraciones generales

Para la detección del SARS-CoV-2, se recomienda el uso de pruebas validadas en el nivel internacional. En este caso, se hace hincapié en las pruebas que utilizan como dianas los fragmentos N1 y N2, desarrolladas por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC, por su sigla en inglés), los cuales detectan fragmentos del gen que codifica para la nucleocápside del SARS-CoV-2. Se debe valorar la factibilidad técnica y económica de probar al menos dos genes diana para la detección de SARS-CoV-2. En caso de no ser posible realizar los ensayos N1 y N2, este grupo impulsor recomienda realizar al menos el ensayo de N1 en duplicado técnico.

Las pruebas de RT-qPCR se realizar utilizando oligonucleótidos por separado: cebador sentido, cebador antisentido y sonda fluorescente. Sin embargo, existen opciones en el mercado que comercializan kits con soluciones listas para su uso, que incluyen tanto los cebadores como la sonda. Este protocolo se basa en la solución de cebadores y sonda desarrollada por la casa comercial IDT: 2019-nCoV RUO Kit[®] (catálogo 10006713). Este kit se desarrolló con base en las recomendaciones de los CDC del 2020, tanto para la prueba N1 como para la N2 (35). El detalle específico de la concentración de cada cebador se puede consultar en la documentación adicional del kit.

En caso de realizar las pruebas con reactivos por separado, se recomienda que la sonda fluorescente esté marcada preferiblemente con carboxifluoresceína (FAM, por su sigla en inglés), y que posea al menos una sustancia que suprima el efecto de luminiscencia (*quencher*) no fluorescente. Además, se recomienda que la concentración final de los cebadores en la reacción sea de 500 nM, y de 125 nM para la sonda. En el cuadro 1 se presenta el detalle de los oligonucleótidos recomendados para realizar las qPCR mencionadas en el presente documento.

En forma paralela a todas las pruebas, deben realizarse controles positivos, controles negativos y controles para evaluar la presencia de inhibidores de qPCR. Estos procedimientos se presentan en el capítulo 7 de esta guía (Control y aseguramiento de la calidad).

Cuadro 1. Secuencia de cebadores y sondas para pruebas de detección del SARS-CoV-2 con base en las recomendaciones de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades del 2019

Cebadores y sondas	Secuencia 5' - 3'
SARS-CoV-2	
2019-nCoV_N1-F2019-nCoV_N1 (sentido)	GACCCCAAATCAGCGAAAT
2019-nCoV_N1-R2019-nCoV_N1 (antisentido)	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG
2019-nCoV_N1-P2019-nCoV_N1 (sonda)	ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC
2019-nCoV_N2-F2019-nCoV_N2 (sentido)	TTACAAACATTGGCCGCAA
2019-nCoV_N2-R2019-nCoV_N2 (antisentido)	GCGCGACATTCCGAAGAA
2019-nCoV_N2-P2019-nCoV_N2(sonda)	ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG

Notas: la sonda para SARS-CoV-2 a menudo se marca con carboxifluoresceína; sin embargo, este fluoróforo puede modificarse sin consecuencias para la reacción. El tipo de marcador utilizado en la sonda se debe especificar siempre en las etiquetas de los tubos y en los protocolos de reacción. Además, se debe asegurar que el marcado que se realice sea compatible con la máquina de qPCR utilizada para las pruebas.

A: adenina; C: citosina; F: hacia adelante (por su nombre en inglés, *forward*); G: guanosina; P: sonda (por su nombre en inglés, *probe*); R: hacia atrás (por su nombre en inglés, *reverse*), T: timina.

6.2. Equipo y reactivos

- Vórtex.
- Microcentrífuga.
- Cámara limpia para PCR.
- Centrífuga.
- Centrífuga de placas.
- Congelador.
- Termociclador de tiempo real.

- Puntas con filtro para micropipetas (de 10, 100 y 1000 μ L).
- Tubos de microcentrifuga de tipo Eppendorf.
- Kit de extracción de ARN a partir de membranas filtrantes.
- Kit de retrotranscripción.
- Mezcla maestra.

Nota: se puede utilizar un equipo similar siempre que esté en las mismas condiciones y esté calibrado.

6.3. Materiales

6.3.1. Área 1

- Agua sin desoxirribonucleasa (ADNasa) ni ribonucleasa (ARNasa).
- Sistema de RT-qPCR en un solo paso (p. ej., SuperScript[®] III Platinum de Invitrogen; AgPath-IDTM[®] de Applied Biosystems; y TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix[®] de Thermo Scientific).
- Cebadores y sondas específicas (véase el cuadro 1).
- Placas ópticas para qPCR, como una placa de reacción óptica de 96 pocillos (p. ej., MicroAmp[®], número de pieza N8010560, de Applied Biosystems).
- Soporte de tarjeta óptica (p. ej., adaptador de base de 96 pocillos MicroAmp[®], catálogo 4375284, de Applied Biosystem).
- Adhesivo para placas ópticas.
- Película adhesiva óptica MicroAmp[®] compatible con PCR, sin ácido desoxirribonucleico, ARN y ARNasa, catálogo 4311971, de Applied Biosystems.
- Soporte frío.
- Gradilla para microtubos.
- Micropipetas (monocanal) de diferentes gradación: 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L.
- Pipeta automática, si está disponible.
- Puntas con filtro nuevas y estériles para diferentes grados de pipeta.

- Microtubos nuevos y estériles de 1,5 o 2 mL.
- Papel de aluminio.

6.3.2. Área 2

- Muestras de ARN extraídas.
- Curva estándar.
- Adaptador de base de 96 pocillos MicroAmp[®], catálogo 4375284, de Applied Biosystems.
- Gradilla para microtubos.
- Micropipetas (monocanal) de diferentes grados: 10 y 20 μ L.
- Puntas con filtro nuevas y estériles para pipetas de diferente gradación.

6.4. Procedimiento

6.4.1. Prueba

- Completar el protocolo, rellenar el mapa de muestras con los respectivos controles (positivo y negativo) y calcular el volumen de mezcla necesario para la qPCR.
- En la zona limpia (área 1), preparar la mezcla en un microtubo, según se explica en los anexos 1 y 2 de este documento.
- Homogeneizar la mezcla utilizando un vórtex y centrifugar durante unos segundos (solo para eliminar las gotas de la mezcla en el tubo). Prestar atención a la calibración del peso de los tubos antes de colocarlos en la centrífuga.
- Colocar la placa qPCR en el soporte frío.
- Distribuir 15 μ L de la mezcla con una micropipeta en cada orificio de la placa según la distribución determinada en el protocolo (véase el anexo 1).
- Si estuviera disponible, utilizar una pipeta automática para distribuir la mezcla.
- Cubrir la placa con el adhesivo aún sellado y con papel de aluminio. Llevar la placa al área de manipulación de ARN (área 2). Si no dispone de papel de aluminio, utilizar toallas de

papel. En el área 2, con la luz interna de la cámara aséptica apagada, agregar 5 µL del ARN con una micropipeta en los orificios correspondientes que contienen la mezcla de qPCR según la distribución determinada en el protocolo (véanse los anexos 1 y 2). Cada muestra debe probarse por duplicado o más, según el proyecto.

- Antes de agregar las muestras de ARN, esperar unos segundos para descongelar y centrifugar los tubos.
- Aún con la luz interna de la cámara aséptica apagada, agregar 5 µL del control positivo (por duplicado) con una micropipeta en los orificios de la placa según la distribución determinada en el protocolo (anexos 1 y 2).

6.4.2. Preparación de un control positivo cuantificable

- Utilizar un control positivo de tipo ADN, que esté cuantificado y que contenga las secuencias de interés que se desean detectar.
- En caso de utilizar un plásmido circular, se recomienda realizar su linearización según las indicaciones de la casa comercial (36).
- No se recomienda la utilización de controles de ARN de banda sencilla debido a su inestabilidad, en especial en ambientes tropicales.
- También cabe la posibilidad de la utilización de una solución estándar de ARN (en países que no presenten un clima tropical), ya que de esta forma se controla la retrotranscripción. Existe una forma comercial disponible de ARN de SARS-CoV-2 congelado que se puede alicuotar y es estable una vez congelado. Al ser de uso comercial, es una buena medida de estandarización entre los diferentes laboratorios.

6.4.3. Preparación de la solución patrón de plasmidios que contengan las secuencias de las dianas que se amplificarán en la reacción de qPCR

- Preparar una solución patrón disolviendo el liofilizado en agua para PCR hasta alcanzar una concentración de 1×10^9 copias/5 µL (1 000 000 000 copias/5 µL). A continuación, separar

alícuotas de la solución patrón en soluciones de un solo uso de 11 μL utilizando tubos de PCR. Almacenar las alícuotas de un solo uso a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta por un año.

- El cálculo del número de copias se puede realizar con herramientas gratuitas como las que se muestran a continuación:
 - Integrated DNA Technologies. Calculations: Converting from nanograms to copy number. [Internet]. Disponible en <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/calculations-converting-from-nanograms-to-copy-number>
 - Scienceprimer.com. Copy number calculator for realtime PCR. [Internet]. Disponible en <http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>

6.5. Preparación de una curva estándar de 5 puntos

Para la cuantificación de SARS-CoV-2, así como para los controles endógenos y de recuperación (PMMoV, crAss-fago] y BRSV), se debe elaborar una curva patrón para cada análisis utilizando una dilución seriada (en el orden 1:10) del control cuantificable del ensayo. La finalidad es que las concentraciones se encuentren idealmente en el rango entre 1×10^1 y 1×10^7 copias/reacción, mientras que el mínimo aceptado es el rango de 1×10^1 (al menos 5 puntos en el rango dinámico del ensayo). Cada reacción se debe realizar por triplicado.

6.5.1. Procedimiento

- Preparar 8 tubos de 1,5 mL y rotularlos desde 1×10^8 hasta 1×10^1 .
- Agregar 90 μL de agua para PCR a cada uno de los tubos antes rotulados.
- Descongelar una alícuota de un solo uso del control positivo con concentración 1×10^9 copias/5 μL .
- Agregar 10 μL de la alícuota de un solo uso al tubo rotulado en el paso 1 como 1×10^8 , homogeneizar suavemente en el vórtex y centrifugar brevemente.

- Utilizar el mismo procedimiento del punto 4, realizar diluciones seriadas a partir del tubo de 1×10^8 hasta obtener una última dilución de 1×10^1 copias/5 μ L.
- Utilizar 5 μ L de las diluciones deseadas (como mínimo, 5 puntos) para construir una curva estándar, en triplicado y con los mismos reactivos e igual programa de amplificación con las cuales se correrán las muestras por analizar.

Nota: todas las curvas patrón deben cumplir con los estándares recomendados para qPCR; es decir, tener al menos 5 puntos por triplicado, valores de coeficiente de determinación obtenido en la prueba estadística de regresión lineal (R^2) $>0,97$, y eficiencias de qPCR entre 90% y 110% (37-39).

6.6. Criterios de interpretación, y cálculo y expresión de los resultados

6.6.1. Criterios de interpretación

Se considerarán positivas todas las muestras que cruzan el umbral y que tienen una curva sigmoidea característica con un valor de umbral de ciclo (Ct, por su sigla en inglés) <40 para los duplicados analizados. La carga viral se expresa como cg/L (copias genómicas del virus por litro de aguas residuales), considerando los volúmenes de la muestra, el concentrado (eluido), los extractos de ácidos nucleicos y la reacción RT-qPCR. Los resultados se considerarán detectables en las muestras en las que se obtengan resultados con Ct <40 en ambas réplicas del duplicado. Los controles de calidad se deben evaluar antes de que se libere el resultado, para garantizar la fiabilidad de los resultados generados.

6.6.2. Cálculo de la concentración viral de SARS-CoV-2

La concentración de SARS-CoV-2 por cada litro de agua residual se calcula tomando en cuenta todos los volúmenes y pasos utilizados durante la concentración, la extracción de AND y ARN, la RT-PCR y la qPCR. Además, se deben establecer claramente los límites de detección y cuantificación, tanto del la prueba de qPCR como del método en general.

Para calcular el número de copias del virus SARS-CoV-2 detectadas en la reacción de PCR, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias del genoma} = 10^{(Ct-b)/m}$$

Donde:

- Ct: valor del ciclo umbral medido para la muestra desconocida.
- b: intersección con el eje y de la curva estándar.
- m: pendiente de la curva estándar.

Para determinar la concentración de SARS-CoV-2 en una muestra desconocida, el número de copias del genoma calculado antes se expresa en relación con la proporción del volumen de muestra de aguas residuales original que se analizó en la reacción de PCR. Esto se puede determinar mediante la fórmula que se describe a continuación y los volúmenes respectivos utilizados en cada paso del proceso de concentración y purificación de la muestra:

$$\text{Cg/L} = \text{número de cg} \times (\text{ARN total/ARN RT-qPCR}) \times (\text{concentrado total/concentrado extraído}) \times (1000 \text{ mL/muestra})$$

Donde:

- Cg: copias genómicas (en el volumen de ARN extraído analizado con RT-qPCR).
- ARN total: volumen total de ARN extraído (mL).
- ARN PCR: volumen de ARN extraído analizado con RT-qPCR (mL).
- Concentrado total: volumen total de concentrado de agua (mL).
- Concentrado extraído: volumen de muestra concentrada utilizada en la extracción de ARN (mL).
- Muestra: volumen de la muestra de agua residual original procesada con el procedimiento de concentración (mL).

Por tanto, en un ensayo con las siguientes variables, y utilizando la fórmula descrita:

- Cg (N1) = 100.
- ARN total = 0,06 mL.
- ARN PCR = 0,005 mL.
- Concentrado total = 0,5 mL.
- Concentrado extraído = 0,140 mL.
- Muestra = 42 mL.

$$\text{Cg N1/L} = 100 \times (0,06 \text{ mL}/0,005 \text{ mL}) \times (0,5 \text{ mL} \times 0,140 \text{ mL}) \times (1000 \text{ mL}/42 \text{ mL}) = 10\ 204 \text{ cg N1/L}$$

7. Control y aseguramiento de la calidad

El control y el aseguramiento de la calidad son importantes en cualquier prueba diagnóstica de rutina, porque garantizan la trazabilidad de los resultados. Sirven para establecer, mantener y garantizar un alto nivel de calidad en el desempeño de un laboratorio para realizar diagnósticos correctos. Se debe prestar especial atención a las pruebas moleculares debido a la probabilidad de contaminación cruzada de ADN y ARN y, en el caso de muestras ambientales, principalmente a los inhibidores de PCR presentes en muestras concentradas, los que podrían generar resultados falsos negativos.

Así, además de los controles positivos, negativos y blanco, se deben realizar controles sobre el proceso de concentración de muestras y extracción de ARN, la reacción de qPCR, y controles internos y endógenos. La participación en pruebas interlaboratorios y pruebas de eficiencia son importantes, principalmente en el contexto de la red, donde se puede usar los resultados para modelar datos y apoyar la vigilancia epidemiológica.

7.1. Control positivo

Los controles positivos de las qPCR pueden obtenerse de plásmidos o ADN lineal con las secuencias de interés (pruebas N1 y N2).

Nota: en caso de que sea posible para el laboratorio, se puede utilizar SARS-CoV-2 inactivado, ya sea con calor o bien tratado con radiación gamma⁷.

7.2. Control negativo

Usar agua sin nucleasas.

⁷ Para más información, véanse los códigos NR52286 (inactivación del SARS-CoV-2 con calor) y NR52287 (inactivación del SARS-CoV-2 con radiación gamma) en: BEI Resources. Supporting infectious disease research. [Internet]. Disponible en https://www.beiresources.org/Organism/120/SARS-CoV-2.aspx?f_instockflag=In+Stock%23~%23Discontinued%23~%23Temporarily+Out+of+Stock.

7.3. Control blanco

Usar un control blanco durante todo el proceso analítico a partir de la concentración con agua destilada o ultrapura estéril. Seguir exactamente el mismo procedimiento que se utilizó para la muestra.

7.4. Prueba de inhibición de la muestra

Dentro de una muestra de aguas residuales, existe la posibilidad de que se encuentren inhibidores de la reacción de qPCR. Como control se deben realizar pruebas en las cuales se demuestre que la muestra es negativa por la ausencia del virus y no por la existencia de sustancias que inhiban la reacción de qPCR. La demostración de inhibición en la reacción de qPCR se realiza con base en los valores de Ct obtenidos en los pozos del plato de PCR donde se analiza una concentración conocida del control positivo, normalmente en un rango de 1×10^3 a 1×10^4 copias/reacción, el cual se utilizará de comparación en términos de Cq para la verificación de la presencia de inhibición en una muestra real.

El valor de Ct de este último debe ser ± 1 Ct en comparación con el calibrador. En caso de ser mayor a 1 Ct, se sugiere volver a analizar la muestra con una dilución de al menos 1:2.

Si es posible, realizar las pruebas con las muestras puras y con las muestras diluidas 1:10, para tener una estimación de la inhibición. Al final de la reacción, se deben comparar los valores de Ct de las muestras crudas y las muestras diluidas (1:10) para verificar la inhibición.

7.5. Pruebas de recuperación

Las pruebas de recuperación viral suelen realizarse con partículas virales muy similares al virus de interés. Para evaluar la eficacia y el desarrollo del método, las cepas de coronavirus de baja patogenicidad (como el virus de la hepatitis murina [VHM] y los coronavirus humanos más conocidos) y el phiØ6 se pueden utilizar como modelos de SARS-CoV-2 por motivos de

bioseguridad (10). Otro sustituto utilizado para evaluar las tasas de recuperación de los métodos de concentración es el BRSV, un virus envuelto de ARN de cadena sencilla (7).

En esta guía de laboratorio se recomienda la utilización del BRSV vacunal (Inforce 3[®], de Zoetis), de acuerdo con la metodología propuesta por Boxus *et al.* (40).

La vacuna Inforce 3[®] contiene virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (cepa RLB 106, muestra termosensible), virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (cepa RLB 103, muestra termosensible) y virus sincitial respiratorio bovino (cepa BRSV/375, muestra viva modificada). Por cada 1 mL de la vacuna, hay aproximadamente 10⁷ copias del gen *BRSV*.

Para utilizar el BRSV, se recomienda seguir los siguientes pasos:

- Agitar en el vórtex para mezclar bien y añadir 1 mL de Inforce 3[®] resuspendido en la muestra de aguas residuales a analizar, para obtener aproximadamente 10 000 copias del gen *BRSV* por mililitro en la matriz de aguas residuales. Se debe cuantificar la concentración del virus agregado para calcular la concentración (concentración inicial).
- Mezclar bien después de agregar Inforce 3[®] y dejar que la muestra se incube a 4 °C durante 30 minutos.
- Para el análisis de qPCR, proceder como el apartado 6.5.1 utilizando los cebadores y sondas especificados en el cuadro 2.

Nota: recargar la muestra de control del proceso antes de cualquier congelación y descongelación permite examinar el efecto de estos procesos en la recuperación.

Cuadro 2. Secuencia de cebadores y sondas para pruebas de detección de BSRV

Cebadores y sondas	Secuencia 5'-3'
BSRV^{a)}	
F	GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT
R	ACACTGTAATTGATGACCCCATCT
P	ACCAAGACTTGTATGATGCTGCCAAAGCA

Notas: ^{a)} Boxus M, Letellier C, Kerkhofs P. Real time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. J Virol Methods. 2005;125:125-130.

A: adenina; BSRV: virus respiratorio sincitial bovino (por su sigla en inglés); C: citosina; F: hacia adelante (por su nombre en inglés, *forward*); G: guanosina; P: sonda (por su nombre en inglés, *probe*); R: hacia atrás (por su nombre en inglés, *reverse*); T: timina.

A continuación, calcular el porcentaje recuperado para cada control:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Promedio de copias de BRSV en la muestra}}{\text{Promedio de copias de BRSV en el calibrador}} \times 100$$

En general, una eficiencia inferior a 10% se considera deficiente.

7.6. Controles endógenos

Siempre y cuando sea posible en términos de factibilidad (por disponibilidad de costos, materiales y personal), se recomienda realizar la prueba de PMMoV o la crAss-fago, o ambas, como controles endógenos del proceso y para normalizar los datos, principalmente en el caso de dilución de las muestras por causa de las lluvias.

Para la prueba de PMMoV se recomienda seguir el ensayo propuesto por Haramoto et al. (41). Esta prueba resulta de utilidad para asegurar que todo el proceso (concentración, extracción y RT-PCR) funcione de manera adecuada y es útil para la detección de un virus de ARN. La prueba PMMoV es conocida por ser una gran indicadora de contaminación de materia fecal en matrices ambientales.

Para la prueba de crAss-fago se recomienda el ensayo desarrollado por Stachler et al. (42). El crAss-fago es un miembro constitutivo del viroma intestinal, un bacteriófago presente en cantidad abundante en la microbiota intestinal y específico de los seres humanos, que puede ayudar a explicar la descomposición y dilución en la infraestructura de las aguas residuales.

En el cuadro 3 se muestran los cebadores y sondas utilizados en la qPCR para la detección de PMMoV y crAss-fago.

Cuadro 3. Secuencia de cebadores y sondas para pruebas de detección de PMMoV y crAss-fago

Cebadores y sondas	Secuencia 5'-3'
PMMoV^a	
PMMVcFP1	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA
PMMV RP1	TTGTCGGTTGCAATGCAAGT
PMMV P	CCTACCGAAGCAAATG
crAssphage (41)	
056F1	CAGAAGTACAACTCCTAAAAACGTAGAG
056R1	GATGACCAATAACAAGCCATTAGC
056P1	AATAACGATTTACGTGATGTAAC

Notas: ^a Haramoto E, Kitajima M, Kishida N, Konno Y, Katayama H, Asami M, Akiba M. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:7413-7418. Disponible en <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.02354-13>.

A: adenina; C: citosina; F: hacia adelante (por su nombre en inglés, *forward*); G: guanosina; P: sonda (por su nombre en inglés, *probe*); R: hacia atrás (por su nombre en inglés, *reverse*); T: timina.

En el anexo 3 se puede consultar en detalle la prueba de control con crAss-fago, y en el anexo 4 se puede consultar en detalle la prueba de control con PMMoV.

7.7. Participación en pruebas interlaboratorio

Debería alentarse a los laboratorios a participar en pruebas de ensayos interlaboratorios para evaluar su desempeño en su realización. Además de los programas de aptitud ya establecidos en el área molecular, como el control de calidad para el diagnóstico molecular, sería muy productivo para la red establecer una prueba entre los laboratorios para establecer la comparabilidad y desempeño de todos ellos.

7.8. Límites de detección y cuantificación

7.8.1. Límite de detección

El límite de detección (LD) es equivalente a la concentración más baja del virus que puede detectarse, pero no necesariamente puede cuantificarse. El LD tiene un nivel alto de incertidumbre y puede establecerse a partir de la desviación estándar del valor que corresponde al límite de cuantificación (LC), o por la repetibilidad del control blanco.

7.8.2. Límite de cuantificación

El LC representa la concentración más baja del virus que se puede cuantificar con una incertidumbre aceptable con base en los resultados establecidos con las concentraciones de una curva analítica.

7.9. Otras pruebas de control de calidad

Se sugiere la realización de pruebas de control de calidad, como la repetibilidad y la reproducibilidad. Se pueden hacer pruebas que permitan establecer la precisión de la medición, a través de la repetibilidad de las pruebas mediante la realización de duplicados experimentales o técnicos en un número determinado de muestras que se analizan el mismo día por las mismas personas. En el caso de la reproducibilidad, se miden duplicados o triplicados de la misma muestra en días diferentes en las condiciones de trabajo del laboratorio. Todo esto se realiza mediante un programa establecido para medir la precisión de la técnica. Una alternativa de

trabajo puede ser la acumulación de información de los duplicados y triplicados de muestras de diferentes lotes de un programa de muestreo de más largo plazo.

8. Condiciones de bioseguridad

Todos los procedimientos de obtención, transporte, manipulación y procesamiento de las muestras de aguas residuales deberán realizarse garantizando la disminución del riesgo de infección por vía aérea o por partículas: el personal deberá utilizar el EPP adecuado para la actividad, y cualquier incidente o accidente deberá ser notificado e investigado de manera oportuna.

Los grupos de riesgo son diferentes al nivel de bioseguridad que se requiere en el laboratorio. El trabajo con el mismo agente biológico, utilizando diferentes procedimientos de laboratorio, requiere diferentes niveles de bioseguridad. En el caso del SARS-CoV-2, la OMS ha definido lo siguiente:

- Las pruebas rápidas y pruebas de diagnóstico inmediato pueden realizarse en un BSL-1.
- Los métodos de diagnóstico no propagativos, como las pruebas de PCR o secuenciación genómica pueden realizarse en un BSL-2.
- Los métodos propagativos, como las pruebas de aislamiento viral o de neutralización pueden realizarse en un BSL-3.
- Otras pruebas que impliquen la manipulación del virus completo pueden realizarse en un BSL-4.

8.1. Recolección de muestras de agua residual

Las muestras deben ser recolectadas por personal capacitado y entrenado. El personal debe utilizar el EPP adecuado para prevenir la transmisión aérea o por partículas. El personal debe recibir la capacitación adecuada para colocarse y retirarse el EPP y debe utilizar guantes, mascarillas, gafas de protección ocular o caretas de protección facial, monos o petos repelentes a fluidos. La higiene de manos antes y después de la recolección de las muestras debe realizarse con alcohol a 70% o gel. Luego de su uso, todos los materiales utilizados deben ser dispuestos

en una bolsa roja para desechos peligrosos y estos deben ser llevados hasta el sitio donde se haya definida la disposición final.

8.2. Procedimientos de laboratorio

Las muestras deben ser procesadas por personal capacitado y entrenado. La capacitación debe incluir una introducción a la configuración del laboratorio, los procedimientos utilizados, las pautas de seguridad, las normas de bioseguridad, la notificación de incidentes y accidentes, y los procedimientos de respuesta ante emergencias.

Cada laboratorio debe efectuar una evaluación del riesgo para determinar si es competente para realizar los análisis necesarios mediante la aplicación de las medidas de control de riesgos apropiadas. La OMS ha publicado una plantilla de valoración de riesgo para facilitar que todos los laboratorios puedan realizar esta evaluación (43).

El personal del laboratorio debe utilizar el EPP adecuado para minimizar los riesgos que conllevan la manipulación y el procesamiento de las muestras. La valoración del riesgo que realice el laboratorio debe permitir determinar si el personal debe usar protección respiratoria, especialmente en procedimientos que puedan generar aerosoles y gotículas, o causar salpicaduras (centrifugación, homogenización, agitación y sonicación, entre otros) (43). Se recomienda que la manipulación de material potencialmente infeccioso, que pueda generar salpicaduras, gotículas o aerosoles, se realice en cámaras de seguridad biológica con mantenimiento y validación adecuados.

Las superficies y el material de laboratorio deben desinfectarse de forma adecuada para evitar los riesgos de infección. Utilizar desinfectantes con actividad probada contra los virus con envoltura (hipoclorito de sodio, etanol, povidona yodada y cloruro de benzalconio, entre otros). Debe realizarse la detección y la separación de los materiales y desechos infecciosos. Cuando la descontaminación de estos no es posible en el área del laboratorio, deben ser embalados de forma hermética para transferirlos al establecimiento con capacidad de descontaminación.

Se recomienda que el personal del laboratorio reciba la vacuna contra el SARS-CoV-2.

8.3. Envío y transporte de muestras

El transporte de muestras en el nivel nacional debe realizarse con cumplimiento de los protocolos y las normativas definidos en el país. Para el transporte internacional de muestras de aguas residuales, las recomendaciones de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA, por su sigla en inglés) refieren lo siguiente: “Las muestras ambientales (es decir, alimentos o agua) no están sujetas a ninguna reglamentación de transporte (a menos que se transporten junto con otras mercancías peligrosas).” (44).

Referencias

1. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med.* 2020;26:672-675. Disponible en <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0869-5?fbclid=IwAR3x2cKnIDqZfFlpOn6R04KCFDkD7y2Fn1jVIQHC1G8Uq9iCt0w8H7OXmpk>.
2. Bivins A, North D, Ahmad A, Ahmed W, Alm E, Been F, et al. Wastewater-based epidemiology: global collaborative to maximize contributions in the fight against COVID-19. *2020;54(13):7754-7757.* Disponible en <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02388>.
3. Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. 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.* 2020;7:511-516. Disponible en <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
4. Nemudryi A, Nemudraia A, Wiegand T, Surya K, Buyukyoruk M, Cicha C, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *Cell Reports Med.* 2020;1(6):100098. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666379120301245>.
5. Ahmed W Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. 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. *Sci. Total Environ.* 2020;728: 138764.
6. Haramoto E, Malla B, Thakali O, Kitajima M. First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci Total Environ.* 2020;737:140405. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7305903/>.

7. Gonzalez R, Curtis K, Bivins A, Bibby K, Weir MH, Yetka K, et al. COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Res.* 2020;186:116296. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>.
8. Mao K, Zhang K, Du W, Ali W, Feng X, Zhang H. The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 2020;17:1-7. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7212976/>.
9. Daughton C. The international imperative to rapidly and inexpensively monitor community-wide Covid-19 infection status and trends. *Sci Total Environ.* 2020;726: 138149. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32315842/>.
10. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, et al. SARS-CoV-2 in wastewater: state of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ.* 2020;739:139076. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720325936>.
11. Hart OE, Halden RU. Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: feasibility, economy, opportunities and challenges. *Sci Total Environ.* 2020;730:138875. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720323925>.
12. Thompson JR, Nancharaiah YV, Gu X, Lee WL, Rajal VB, Haines MB, et al. Making waves: wastewater surveillance of SARS-CoV-2 for population-based health management. *Water Res.* 2020 ;184:116181. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7357518/>.
13. Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, Maday Y, Teyssou R, Richard E, et al. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *medRxiv.*2020. Disponible en <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.12.20062679v2.full>.

14. Haramoto E, Kitajima M, Hata A, Torrey JR, Masago Y, Sano D, Katayama H. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 2018;135:168-186. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135418301039>.
15. La Rosa G, Bonadonna L, Lucentini L, Kenmoe S, Suffredini E. Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods-A scoping review. *Water Res.* 2020;115899. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313542030436X>.
16. Patel M, Chaubey AK, Pittman Jr CU, Misna T, Mohan D. Coronavirus (SARS-CoV-2) in the environment: Occurrence, persistence, analysis in aquatic systems and possible management. *Sci Total Environ.* 2021;765:142698. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7531938/>.
17. La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Ferraro GB, Veneri C, Bonadonna L, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ.* 2020;736:139652. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32464333/>.
18. Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, Maranhão AG, Siqueira MM, Miagostovich MP. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115: e200196. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32725059/>.
19. Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simón P, Allende A, Sánchez G. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 2020;181:115942. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7229723/>.
20. Wilton T, Bujaki E, Klapsa D, Fritzsche M, Mate R, Martin J. Rapid increase of SARS-CoV-2 variant B. 1.1. 7 detected in sewage samples from England between October 2020 and January

2021. medRxiv. 2021. Disponible en

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.03.03.21252867v1>.

21. Organización Mundial de la Salud. Situación de la vigilancia ambiental del SARS-CoV-2.

Reseña científica, 5 de agosto del 2020. Ginebra: OMS; 2020. Disponible en

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333862/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-EnvironmentalSampling-2020.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

22. Wu F, Zhang J, Xiao A, Gu X, Lee WL, Armas F, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *Msystems*. 2020;5(4). Disponible en

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mSystems.00614-20>.

23. Ahmed W, Bibby K, D'Aoust PM, Delatolla R, Gerba CP, Haas CN, et al. Differentiating between the possibility and probability of SARS-CoV-2 transmission associated with wastewater: empirical evidence is needed to substantiate risk. *FEMS Microbes*. 2021;2:xtab007.

Disponible en

<https://academic.oup.com/femsmicrobes/article/doi/10.1093/femsmc/xtab007/6263640>.

24. Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:4485-4488.

25. Ahmed W, Harwood VJ, Gyawali P, Sidhu JPS, Toze S. Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(6):2042-2049.

26. Ahmed W, Bertsch PM, Bivins A, Bibby K, Farkas K, Gathercole A, et al. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci Total Environ*. 2020;739:139960. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972033480X>.

27. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for Environmental Surveillance of Poliovirus Circulation. Ginebra: OMS; 2003. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67854>.
28. Guerrero-Latorre L, Ballesteros I, Villacrés-Granda I, Granda MG, Freire-Paspuel B, Ríos-Touma B. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. *Sci. Total Environ.* 2020;743:140832. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720343564>.
29. Ahmed W, Bertsch PM, Bibby K, Haramoto E, Hewitt J, Huygens F, et al. Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environ Res.* 2020;191: 110092.
30. Wang J, Feng H, Zhang S, Ni Z, Ni L, Chen Y, et al. SARS-CoV-2 RNA detection of hospital isolation wards hygiene monitoring during the coronavirus disease 2019 outbreak in a Chinese hospital. *Int J Infect Dis.* 2020;94:103-106. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197122030237X>.
31. Rimoldi SG, Stefani F, Gigantiello A, Polesello S, Comandatore F, Mileto D, et al. Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *STOTEN.* 2020;744: 140911. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>.
32. Or IB, Yaniv K, Shagan M, Ozer E, Erster O, Mendelson E, et al. Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance. *medRxiv* 2020.04.26.20073569. Disponible en doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20073569.16>.
33. Zhang D, Ling H, Huang X, Li J, Li W, Yi C, et al. Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital. *Sci Total Environ.* 2020;741:140445. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004896972033967X>.

34. Agrawal S, Orschler L, Lackner S. Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in southern Germany. *Sci. Rep.* 2011;11:1-7.
35. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. Métodos de análisis de vigilancia de aguas residuales. Atlanta: CDC; 2020. Disponible en <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/wastewater-surveillance/testing-methods.html>.
36. Pecson BM, Darby E, Haas CN, Amha YM, Bartolo M, Danielson R, et al. Reproducibility and sensitivity of 36 methods to quantify the SARS-CoV-2 genetic signal in raw wastewater: findings from an interlaboratory methods evaluation in the US. *Environ Sci Water Res Technol.* 2021;7:504-520. Disponible en <https://doi.org/10.1039/D0EW00946F>.
37. Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FSB, Olsvik PA, et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Biol Mol.* 2010;11(74).
38. Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods.* 2013;10: 1063-1067.
39. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. 2009;55(4):611-622. Disponible en <https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762>.
40. Boxus M, Letellier C, Kerkhofs P. Real time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol Methods.* 2005;125:125-130.
41. Haramoto E, Kitajima M, Kishida N, Konno Y, Katayama H, Asami M, Akiba M. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:7413-7418. Disponible en <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.02354-13>.

42. Stachler E, Kelty C, Sivaganesan M, Li X, Bibby K, Shanks OC. Quantitative CrAssphage PCR assays for human fecal pollution measurement. *Environ Sci Technol*. 2017;51:9146-9154.

Disponible en <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.7b02703>.

43. Organización Mundial de la Salud. Orientaciones sobre la bioseguridad en el laboratorio relacionada con la COVID-19: orientaciones provisionales 28 de enero del 2021. Ginebra: OMS; 2021. Disponible en <https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO-WPE-GIH-2021.1>.

44. Organización Mundial de la Salud. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022. Ginebra: OMS; 2021. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>.

Anexo 1. Diseño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción inversa para la detección del coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo grave⁸

Fecha:											
Protocolo:	Genes N1 y N2										
Técnico:	Marcador de sonda 5' = FAM										
Muestras:											
Kit: SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit	PCR (reacción de 20 µL)										
Lote:	Volumen y reacción	# Reacciones									
Fecha de caducidad:	Mezcla maestra de PCR 10,0 µL										
	ROX (1:10) 0,4 µL										
	RT SIII/Taq 0,4 µL										
H ₂ O:	H ₂ O 2,7 µL										
Cebadores	Cebador o sonda mezcla (N1 o N2) 1,5 µL										
Fabricante:	IDT										
Fecha de síntesis:											
Lote:											
	Reacción total 15,0 µL										
	Muestra (ARN o ADNc) 5,0 µL										
Termociclador:	Programa RT										
	Transcripción reversa 50 °C 30min										
Cabina de bioseguridad	Desnaturalización 95 °C 10min										
Cabina de bioseguridad	45x 95 °C 15 seg										
	Alineamiento y extensión } 55 °C 30 seg										
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

⁸ Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. CDC's diagnostic test for COVID-19 only and supplies. Atlanta: CDC; 2020. Disponible en <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html>.

Termociclador: ABI 7500-VC 0710 () Otros: Cabina de bioseguridad (manipulación de muestras de ARN o ADNc):	Programa RT											
	Transcripción reversa	50 °C	30 min									
	Desnaturalización	95 °C	10 min									
	40x		95 °C	15 seg								
		Alineamiento y extensión	60 °C	30 seg								
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	

Anexo 3. Diseño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción del fago de ensamblaje cruzado del virus(crAss-fago)¹⁰

Fecha:	Gen		Marcado de sonda 5' = HEX o VIC
Protocolo:			
Técnico:			
Muestras:			
Kit: SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit Lote: Fecha de caducidad:	PCR (reacción de 20 µL)		Reacciones
	Volumen y rReacción		
	PCR Master Mix	10,0 µL	
	ROX (1:10)	... 0,4 L	
	RT SIII / Taq	... 0,4 L	
H ₂ O:	H ₂ O	... 20,04 µL	
Curva estándar:			
Cebadores: Fabricante: Fecha de síntesis: Lote:	Cebador 056F1 (10 µM)	2,0 µL	
	Cebador 056R1 (10 µM)	2,0 µL	
	Sonda 056P1 (10 µM)	0,16 µL	
Cebadores: Fabricante: Fecha da síntesis: Lote:	Reacción total	15 µL	
	Modelo (ARN o ADNc)	5 µL	–
Termociclador: ABI 7500 – VC 0710 () Otros: Cabina de bioseguridad (manipulación de muestras de ARN o ADNc):	Programa RT		
	Transcripción reversa	50 °C	30min
	Desnaturalización	95 °C	10min
	1	40x	95 °C 15 seg
	Alineamiento y extensión	60 °C	30 seg

¹⁰ Stachler E, Kelty C, Sivaganesan M, Li X, Bibby K, Shanks OC. Quantitative CrAssphage PCR assays for human fecal pollution measurement. Environ Sci Technol. 2017;51:9146-9154. Disponible en <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.7b02703>

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Anexo 4. Diseño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para la detección del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV)¹¹

Fecha: **Gen**
 Protocolo: Marcado con sonda 5' = HEX o VIC
 Técnico:

Muestras:		
Kit: SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit: Lote: Fecha de caducidad:	PCR (reacción de 20 µL)	
	Volumen y reacción	Reacciones
H ₂ O:	Mezcla maestra de PCR	10,0 µL
Curva estándar:	ROX (1:10)	0,4 µL
	RT SIII / Taq	0,4 µL
Cebadores:	H ₂ O	2,2 µL
Fabricante:	Cebador PMMoV-F (10 µM)	0,8 µL
Fecha de síntesis:	Cebador PMMoV-R (10 µM)	0,8 µL
Lote:	Sonda PMMoV-S (10 µM)	0,4 µL
Cebadores:	Reacción total	15 µL
Fabricante:	Modelo (ARN o ADNc)	5 µL
Fecha de síntesis:		–
Lote:		
Termociclador:	Programa RT	
ABI 7500 – VC 0710 ()	Transcripción reversa	50 °C 30 min
Otros:	Desnaturalización	95 °C 10 min
Cabinas de bioseguridad (manipulación de muestras de ARN o ADNc):	1	40× 95 °C 15 seg
		Alineamiento y extensión

¹¹ Haramoto E, Kitajima M, Kishida N, Konno Y, Katayama H, Asami M, Akiba M. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:7413-7418. Disponible en <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.02354-13>

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Anexo 5. Preparación de reactivos

Tampón fosfato salino 10× (PBS, por su sigla en inglés)

NaCl.....	80 g
KCl.....	2 g
Na ₂ HPO ₄	11,45 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Agua destilada.....	1000 mL

Disolver todos los reactivos en un vaso de precipitados con 800 mL de agua. Después de la disolución total, completar hasta 1000 mL y luego esterilizar en el autoclave. El pH se puede ajustar con HCl o NaOH.

PBS 1×

PBS 10×.....	100 mL
Agua destilada.....	900 mL

Diluir el PBS en un vaso de precipitados. Después de la disolución total, traspasar a una botella de vidrio etiquetada y guardarla en el refrigerador.

PBS 2x

PBS 10 x.....200 mL

Agua destilada (cantidad suficiente).....800 mL

Diluir el PBS en un vaso de precipitados. Después de la disolución total, traspasar a una botella de vidrio etiquetada y guardarla en el refrigerador.

Glicina 0,25N (pH 9,5)

Glicina.....18,77 g

Agua destilada (cantidad suficiente).....1000 mL

Disolver el reactivo en un vaso de precipitados con 800 ml de agua. Después de la disolución total, completar hasta 1000 mL. Traspasar a una botella de vidrio y esterilizar en autoclave. Etiquetar el frasco y guárdarlo en el refrigerador.