

Universidad de Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica.

Título del trabajo: Optimización de una metodología para la detección de SARS-CoV-2 en
aguas residuales en Costa Rica.

Alexander Josué Segura Villalta

B87503



Julio, 2023

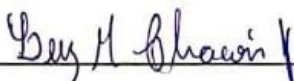
Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



Dr. Luis César Rivera Montero
Tutor



Dra. Kenia Barrantes Jiménez
Lectora 1



Dra. Luz Chacón Jiménez
Lectora 2



Dr. José Arturo Molina Mora
Presidente del Tribunal



Dra. Alexandra Rucavado Romero
Profesora designada

Dedicatoria

A mi madre que desde el cielo me guía y a todas las personas que desde acá me han apoyado incondicionalmente.

Índice general

Portada.....	1
Dedicatoria.....	3
Justificación e hipótesis.....	5
Objetivos.....	6
Resumen.....	7
Marco teórico.....	8
Metodología.....	19
Resultados.....	24
Discusión.....	28
Conclusiones.....	36
Referencias Bibliográficas.....	38

Justificación e hipótesis

A raíz del surgimiento de la pandemia del COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, se volvió necesario aplicar nuevas herramientas que brinden información acerca del estado nacional de la infección. El seguimiento epidemiológico por parte del laboratorio clínico, si bien es parte trascendental, no es suficiente para englobar todo el estatus de la pandemia; ya que solo se contabilizan pacientes sintomáticos con pruebas positivas. Aunado a lo anterior, por carencia de una buena organización de los datos obtenidos, aunque se cuente con un buen sistema diagnóstico, el acceso a información actualizada puede no ser óptimo.

Para ello se requiere estandarizar una metodología enfocada en la epidemiología basada en aguas residuales (EAR) que detecte el SARS-CoV-2; con el fin de cuantificar el ARN viral en muestras obtenidas de plantas de tratamiento. Un método de este tipo permite abarcar tanto pacientes asintomáticos como aquellos con sintomatología leve, moderada o severa; al mismo tiempo que se brinda información epidemiológica en tiempo real y a un buen costo-beneficio. Todo esto con el fin de contar con una herramienta que pueda usarse para el seguimiento de brotes epidémicos de la infección.

Se hipotetiza, entonces, que a partir de un proceso de concentración, extracción y amplificación del material genético del virus SARS-CoV-2, avalado por un control interno [*Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV)] y un virus subrogado [coronavirus bovino (BCoV)], sea posible asociar la concentración obtenida en copias/L con el avance de la COVID-19 en el territorio costarricense. Esto con el fin de evidenciar una tendencia al incremento o descenso en el número de casos que puede ser de utilidad para la toma oportuna de decisiones por parte de las autoridades de salud competentes.

Objetivos

Objetivo general:

- Estandarizar un método de concentración y cuantificación de SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales en San José, Costa Rica.

Objetivos específicos:

- Identificar las metodologías de concentración y extracción de ARN aptas para concentrar SARS-CoV-2 a partir de aguas residuales mediante una revisión de la literatura y de los recursos disponibles.
- Comparar los porcentajes de recuperación de las metodologías disponibles utilizando un virus subrogado de SARS-CoV-2 y un control interno en muestras de aguas residuales mediante RT-qPCR.
- Estimar la carga viral de SARS-CoV-2 en aguas residuales utilizando la metodología con mejor porcentaje de recuperación del virus subrogado mediante RT-qPCR.

Resumen

A raíz de la pandemia, diferentes esfuerzos se han llevado a cabo para conocer el estatus de la infección a nivel nacional. Si bien, es posible llevar a cabo un seguimiento clínico del estado epidemiológico, el análisis del material genético viral en muestras de plantas de tratamiento se posiciona como una mejor alternativa al englobar pacientes sintomáticos y asintomáticos, y al brindar información del estado de la infección en tiempo real. El virus SARS-CoV-2, un betacoronavirus envuelto, codifica por la proteína “espícula” (S), la cual media el contacto directo con el receptor celular, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2). Ambas proteínas se encuentran en las células del tracto gastrointestinal, permitiendo la infección, replicación y la expulsión de partículas virales a través de las heces. Por esta misma excreción es que es posible detectar al SARS-CoV-2 en muestras de agua residual. Por ello, para esta detección se planteó inicialmente una metodología que combinaba el uso de PEG con $MgCl_2$ con dos kits de extracción distintos: el PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit y el Zymo Environ Water RNA kit. Además, con este último se aplicó un protocolo que solo empleaba únicamente PEG como método de concentración. Para evaluar el rendimiento, se utilizó como virus subrogado al BCoV, virus del mismo género; obteniéndose que el mejor método de recuperación fue la concentración con PEG junto a la extracción con el kit Zymo Environ Water RNA ($6.06\% \pm 1.38\%$). Una vez esto fue dilucidado, se procedió a utilizar esta metodología para la cuantificación del SARS-CoV-2 por medio de RT-qPCR. Se obtuvo que únicamente fue posible cuantificar al virus SARS-CoV-2 en 16 de las 34 muestras procesadas durante el año 2022. Para muestras de afluente se obtuvo un promedio de $\log_{10} 5.71$ copias/L y para el efluente el número promedio de copias/L fue de $\log_{10} 6.12$. Se concluye que sí es factible el uso de esta metodología para cuantificar y evaluar el transcurrir de la infección por COVID-19. Esto con el fin de alertar de manera oportuna cambios drásticos en la prevalencia de la enfermedad para tomar las medidas sanitarias correspondientes.

Marco teórico

Los coronavirus son miembros de la familia *Coronaviridae* y se caracterizan por ser virus envueltos pleomórficos de ARN monocatenario de sentido positivo (27-32 kb) y con un tamaño que ronda entre los 80-160 nM (Harrison, Lin & Wang, 2020; Sodhi & Singh, 2022). A grandes rasgos, son virus patógenos para humanos y animales que se asocian a infecciones respiratorias y gastrointestinales. Solían considerarse patógenos humanos menores, ya que eran responsables de causar cuadros de resfriado común o infecciones respiratorias leves en personas inmunocompetentes (Randazzo *et al.*, 2020). Sin embargo, aquellos del género Betacoronavirus en las últimas dos décadas han sido causantes de brotes a gran escala con una considerable mortalidad, destacándose el *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), *Middle Eastern Respiratory Syndrome* (MERS), y el causante de la pandemia recién terminada.

Este nuevo coronavirus fue oficialmente nombrado como *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) y la enfermedad causada como *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). El reporte de los primeros se remonta a diciembre del 2019 en China; a partir de donde se fue expandiendo al punto de ser considerado una emergencia de salud pública de interés internacional el 30 de enero del 2020 y como pandemia el día 11 de marzo de ese mismo año. Sin embargo, para el día 05 de mayo del 2023, la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso fin a este estado de emergencia. Lo anterior fue considerado al notar una tendencia decreciente en las muertes, hospitalizaciones y admisiones a cuidados intensivos por COVID-19, y por los altos niveles de inmunidad de la población al SARS-CoV-2 (OMS, 2023).

Como cualquier enfermedad infecciosa, las manifestaciones de la COVID-19 dependen del agente (el SARS-CoV-2) y del hospedero humano (comorbilidades y factores genéticos) (Molina-Mora *et al.*, 2022). Esta infección a través del tiempo ha ido modificando su sintomatología de acuerdo a las diferentes variantes que han surgido; sin embargo, de manera general puede mencionarse que, al igual que otros coronavirus, lo usual es que se presente fiebre, tos seca, dolor de cabeza, escalofríos, fatiga, pérdida del gusto y el olfato, náuseas, diarrea y, en casos más severos, disnea e infiltración pulmonar bilateral (Hu *et al.*, 2021). Propiamente en territorio costarricense Molina-Mora *et al.* (2022) identificaron un total de 18 síntomas que se presentaban en al menos 1% de la población. Con base en estos, fue posible identificar y describir, empleando la herramienta de *machine learning*, siete perfiles clínicos al momento del diagnóstico de la infección. Estos perfiles mostraron un clado que agrupaba a aquellos pacientes asintomáticos, y otros que englobaban un conjunto de síntomas en

específico. Con lo dicho, puede notarse que la manifestación de la enfermedad de COVID-19 puede variar desde pasar desapercibida hasta poner en peligro la vida, necesitando hospitalización (Dutta *et al.*, 2022).

Este virus en particular posee 14 *open reading frames* (ORFs) que codifican para una diversidad de proteínas no estructurales, accesorias y estructurales (Harrison, Lin & Wang, 2020). Dentro de las proteínas estructurales destacan 4: espícula (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (Hu *et al.*, 2021); influyendo algunas de ellas en la patogénesis viral.

De manera general, una infección viral se inicia cuando los viriones entran en contacto y se unen a los receptores complementarios presentes en las células del hospedero. Propiamente para el SARS-CoV-2, la proteína S es quien media el contacto directo con el receptor celular, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) (Harrison, Lin & Wang, 2020). Sin embargo, este proceso de entrada viral no es así de simple. Se requiere un procesamiento proteolítico para la escisión de la proteína S; esto implica un corte proteico en el sitio S1/S2 (Hoffmann *et al.*, 2020). Este paso es llevado a cabo por una serie de proteasas, donde destaca, entre otras, la TMPRSS2. Una vez este corte ha sido realizado, los virus ingresan a la célula hospedera por endocitosis o por fusión directa con las membranas celulares; liberándose el ARN en el citoplasma. En este compartimento celular, el virus utiliza la maquinaria ribosómica de la célula hospedera para la traducción y síntesis de proteínas necesarias para el ensamblaje de nuevos viriones (Basavaraju *et al.*, 2021).

La evidencia indica que la TMPRSS2 se coexpresa con la ECA2 en células epiteliales nasales, pulmones y ramas bronquiales, lo que explica parte del tropismo tisular del SARS-CoV-2 (Hu *et al.*, 2021) y parte de la sintomatología asociada. Mas estos no son los únicos tejidos donde se encuentran; de hecho, ECA2 y TMPRSS2 se expresan abundantemente en el tracto intestinal humano, específicamente en el borde en cepillo de los enterocitos (Harrison, Lin & Wang, 2020), siendo entonces un posible sitio de infección. Esto concuerda con el hecho de que se presenten síntomas gastrointestinales, como dolor estomacal, diarrea, náuseas y vómitos en un 2-35% de los pacientes infectados con el virus (Amirian, 2020).

Ahondando en este hallazgo, se sugiere que después de la entrada viral al enterocito, el ARN y las proteínas específicas del virus se sintetizan en el citoplasma para ensamblar nuevos viriones, que pueden liberarse en el tracto gastrointestinal a partir de estas células infectadas (Xiao *et al.*, 2020). Incluso ha sido posible detectar ARN viral y partículas virales infecciosas en muestras de heces de pacientes infectados (Mukhra, Krishan & Kanchan, 2020), con duraciones de positividad entre 1 y >30 días después del inicio de la enfermedad (Amirian, 2020). Además, se ha reportado la detección de este coronavirus a partir de muestras de heces

antes de la aparición de síntomas, lo que indica la ventaja de una detección temprana (Peccia *et al.*, 2020)

En un estudio llevado a cabo en Hong Kong se observó que el 15,3% de los pacientes sin síntomas gastrointestinales excretaban el ARN viral en sus heces, de forma que no es indispensable mantener un cuadro diarreico para liberar los ácidos nucleicos del virus. Sin embargo, sí se evidenció que los pacientes con diarrea tenían una mayor cantidad de carga viral en las heces al compararlos con aquellos que no (Cheung *et al.*, 2020). Incluso se ha evidenciado que pacientes totalmente asintomáticos pueden excretar el virus en heces (Tang *et al.*, 2020). Además, se demostró que, durante el curso de la enfermedad, aproximadamente el 50% de los pacientes muestran excreción viral en las heces (El Ouali *et al.*, 2021) y que el 70,3% posee una excreción prolongada de ARN viral en las heces al compararlos con muestras nasofaríngeas (Cheung *et al.*, 2020). En el caso de Costa Rica, es poca la información referente a los porcentajes de excreción del virus en heces, tanto en personas sintomáticas como asintomáticas. Sin embargo, Molina-Mora *et al.* (2022), en el estudio mencionado anteriormente, indican que si bien los síntomas digestivos están presentes entre los casos de pacientes infectados por SARS-CoV-2, su frecuencia es muy baja.

Por esta misma excreción en heces del virus, es que también es posible monitorear la presencia de material genético del SARS-CoV-2 en aguas residuales. Se estimó que la carga viral en las heces de las personas positivas para el SARS-CoV-2 es entre $5 \cdot 10^3$ y $10^{7,6}$ copias/mL, según el curso de la infección. Sin embargo, en aguas residuales las heces se diluyen y la carga viral disminuye considerablemente hasta un rango de 2 copias/100 mL a $3 \cdot 10^3$ copias/mL, dependiendo del nivel de la epidemia (Foladori *et al.*, 2020). Cabe destacar que junto a las heces, la saliva y el esputo de personas infectadas también colaboran en cierta medida con la cantidad de virus presente en las aguas residuales.

La vigilancia de las aguas residuales ha sido de ayuda para estimar el número de infectados que prevalecen en una comunidad. Este concepto ha sido adoptado con el nombre de epidemiología basada en aguas residuales (EAR). Una planta de tratamiento de aguas residuales recoge los desechos emitidos por cientos de miles de personas; de forma que la detección y cuantificación exitosa de un virus indica la prevalencia de la infección en un área geográfica en particular (Mallapaty, 2020).

Un análisis de este tipo conlleva una serie de aspectos ventajosos que lo hacen de gran utilidad. Lo más evidente es una reducción de tiempo y recursos al no evaluar a cada persona individualmente, y que abarca tanto a pacientes asintomáticos como a aquellos con sintomatología leve, moderada o severa (Mallapaty, 2020). Esto ha tomado particular

importancia a raíz de la pandemia por COVID-19. En una publicación en su página web, CDC (2023) va más profundo y resalta que la EAR:

- Brindan una muestra representativa de la población, de incluso miles o millones de individuos.
- Son de utilidad para recolectar datos de comunidades donde las personas no tienen acceso a la atención médica o donde las pruebas clínicas de COVID-19 no están disponibles.
- Permiten detectar el SARS-CoV-2 antes de que los datos provenientes de laboratorios clínicos sean informados a los funcionarios de salud pública.
- Con un aumento modesto en el nivel de virus se evidencia un gran aumento en el número de casos a nivel poblacional.
- Captura información sobre todos los tipos de infecciones por COVID-19.
- Logra una detección temprana de casos en aumento, ya que los datos generados a partir del muestreo de aguas residuales pueden mostrar cambios en las tendencias de la infección de 4 a 6 días antes de que esos cambios se observen en el número de casos clínicos.

Para dimensionar la importancia que ha tomado, la Unión Europea solicitó a sus Estados miembros la implementación de un control de las aguas residuales para rastrear el SARS-COV-2 y sus variantes. Luego de esta petición, para el año 2022, se logró que se procesaran alrededor de 1370 plantas de tratamiento de aguas residuales para la vigilancia periódica del virus. Incluso, se promovió el empleo de métodos comunes para el muestreo, la detección y el análisis de datos, de forma que los resultados fueran más fácilmente comparables. La información obtenida se encontró a disposición de todos los participantes, permitiendo una toma de decisiones coordinada e informada en respuesta a la pandemia. Por su gran utilidad, la Unión Europea continúa destacando a la EAR como una actividad que debe fortalecerse para detectar futuras amenazas por patógenos y contaminantes de preocupación emergente para la salud pública (European Commission, 2022).

De manera similar ocurrió en Estados Unidos, donde, en respuesta a la pandemia, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) propusieron el Sistema Nacional de Vigilancia de Aguas Residuales. Esto con el fin de rastrear la presencia de SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales recolectadas en todo el país para determinar la prevalencia de COVID-19 en las diferentes comunidades. El impacto ha sido tal que en el transcurso de la pandemia más de 100 millones de dólares fueron destinados para dicho propósito, alcanzando 46 estados, 5 ciudades y 2 territorios. Se menciona que para

octubre del 2022, más de 1250 sitios de prueba habían comenzado los esfuerzos de vigilancia de aguas residuales; recolectándose más de 90,000 muestras e incluyendo 133 millones de personas (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2023).

En el caso del territorio costarricense, Centeno y Murillo (2019), analizaron las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en términos de capacidad instalada y tecnología utilizada. A grandes rasgos, estudiaron 47 plantas administradas por entidades públicas (si bien se estima que el total es de 58) y 382 sistemas dirigidos al tratamiento de aguas ordinarias y tramitados por parte del Colegio Federado de Ingenieros y Arquitectos de Costa Rica con su herramienta de Administrador de Proyectos de Construcción. Los resultados que obtuvieron muestran que, tanto para las entidades públicas como para los proyectos privados analizados (condominios, urbanizaciones y otros desarrollos similares), lo usual es que las PTAR sean de pequeña capacidad (caudal menor a 25 L/s) y que empleen alguna modalidad de la tecnología de lodos activados (especialmente la de los lodos activados de aireación extendida). Además, se resalta que únicamente una planta de tratamiento de aguas residuales en San José (PTAR-SJ) es considerada como muy grande. Esta última es operada por el AyA, posee una capacidad de 2,81 m³/s, permitiendo tratar las aguas residuales de más de 1 millón de habitantes distribuidos en 11 cantones de la provincia de San José; sin embargo, funciona solamente con un tratamiento primario.

Para otras naciones de la región se observa un panorama ligeramente diferente. Noyola *et al.* (2015) analizaron una muestra de 1842 PTAR de Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, México y República Dominicana. Entre ellos, lo más usual son los sistemas de pequeña capacidad; únicamente que a un porcentaje menor que en el caso de Costa Rica. En cuanto a la tecnología empleada, para los países citados predominan los sistemas lagunares; discrepando de lo que se observa en Costa Rica, donde son mayoritariamente de lodos activados.

En este momento cabe destacar que la forma en que se lleva a cabo el análisis es variable dependiendo de las características económicas del país que la desarrolle. Keshaviah *et al.* (2023) evaluaron los sistemas de monitoreo de aguas residuales en 43 países, 16 de ellos considerados de ingresos bajos y medios, y 27 de ingresos altos. En el caso de estos últimos, fue más usual la toma de muestra compuesta y poseían un tiempo de análisis promedio de 2-3 días. En contraparte, los países de ingresos medios y bajos, empleaban comúnmente la toma de muestra simple (cuya cantidad difícilmente alcanzaba la mitad del total de las muestras tomadas por los países de ingresos altos) y tardaban 4-5 días. Además, este grupo de investigación hace énfasis en que la comunidad científica que evalúa las aguas residuales se encuentra desarticulada, y actúa más a nivel local que a nivel global. En esta misma línea, se menciona

que los programas que operan de forma aislada o dentro de redes pequeñas son más usuales en países de bajos y medianos ingresos; por lo que la información que generan no se extiende más allá de sus fronteras (Keshaviah *et al.*, 2023).

En términos propiamente de la metodología, la EAR conlleva un muestreo, y un proceso de concentración, extracción y detección del material genético viral. Anteriormente, ha sido utilizada para virus no envueltos, sin membrana, principalmente agentes virales entéricos como enterovirus, adenovirus, norovirus, rotavirus, astrovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E y poliovirus (Bofill-Mas & Rusiñol, 2020; Alygizakis *et al.*, 2021). De esta forma, se posee un respaldo de su efectividad para advertir y notificar el estado de brotes en curso; sin embargo, cabe recalcar que por las diferencias estructurales que presentan estos virus desnudos y el SARS-CoV-2, que posee membrana, podría causar una diferencia en la efectividad de la concentración e incluso en la viabilidad propia del virus.

En Costa Rica, en años anteriores se han realizado esfuerzos para aplicar la EAR en nuestro contexto. Causanilles *et al.* (2017) emplearon esta herramienta para detectar la presencia de drogas ilícitas de abuso y medicamentos en aguas residuales. Más recientemente, Chacón-Jiménez *et al.* (2022) evaluaron la presencia de genes de virulencia vinculados con patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica, con la técnica de PCR punto final, a partir de muestras recolectadas en PTAR de la Gran Área Metropolitana. En cuanto a la determinación de patógenos, Chacón *et al.* (2021) analizó la presencia de virus entéricos humanos (rotavirus A, norovirus GI, norovirus GII, enterovirus y virus de la hepatitis A) en los afluentes de cinco PTAR municipales mediante PCR punto final y tiempo real.

Para la COVID-19, múltiples estudios han sido publicados con el fin de correlacionar el nivel del virus en aguas residuales con la propagación del COVID-19 y el número de infectados. Sin embargo, no existían protocolos estandarizados para la detección del virus al inicio de la pandemia; de esta forma, la metodología empleada debe ser probada y avalada por cada centro de investigación.

Medema *et al.* (2020) resaltan como los pioneros en realizar un estudio con este enfoque. Fue llevado a cabo en marzo del 2020 en Países Bajos y resalta el uso de la ultrafiltración empleando Centricon® Plus-70 como método de concentración. Posteriormente en la fase de detección se evidenció la presencia del ARN viral en las muestras de aguas residuales tiempo antes de que el primer caso de COVID-19 fuese confirmado en esa localidad (Medema *et al.*, 2020).

Peccia *et al.* (2020) mostraron que el monitoreo de este coronavirus en aguas residuales correlaciona con la curva epidemiológica de la COVID-19 y que puede prever brotes hasta 6

días antes de que se dé un aumento de pruebas positivas en la población y de 1 a 4 días antes del incremento de admisiones de infectados al hospital. De manera similar, Saguti *et al.* (2021) hallaron una correlación entre el aumento de las concentraciones de genomas virales en las aguas residuales y el número de pacientes hospitalizados nuevos con COVID-19, precediendo el primero al segundo en tres o cuatro semanas.

Wu *et al.* (2020), en un estudio desarrollado en marzo del 2020 en Estados Unidos, determinaron que los títulos virales observados fueron significativamente más altos de lo esperado según los casos clínicamente confirmados, sugiriendo que la cantidad de casos positivos es mucho mayor que la cantidad de casos diagnosticados. Para llegar a esos resultados, 40mL de las muestras de aguas residuales fueron prefiltradas para eliminar células bacterianas y desechos. Posteriormente, para la precipitación viral se añadieron polietilenglicol 8000 (8% p/vol) y NaCl (0,3 M). Se agitaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se centrifugaron a 12000 g durante 2 horas. A continuación, el sedimento viral se resuspendió en 1,5 ml de TRIzol para la posterior extracción de ARN. Cabe destacar que tanto en este estudio, al igual que en similares, emplean al *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) como un control interno para normalizar las diferentes muestras.

PMMoV es un virus no envuelto con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo (Kitajima, Sassi & Torrey, 2018). Zhang *et al.* (2006) demostró que los virus de plantas son los miembros más abundantes del viroma intestinal humano. Entre ellos, el PMMoV, aun cuando es un patógeno vegetal, es el virus más frecuente en las muestras fecales. En este tipo de muestras, puede ser encontrado a una concentración de hasta 10^9 copias/g de heces (Zhang *et al.*, 2006). Esta excreción se debe a la ingesta de chiles o productos procesados que contienen pimientos infectados (Dhakar & Geetanjali, 2022). Notando su alta concentración en heces, puede asumirse que este virus es bastante estable y puede atravesar el tracto gastrointestinal fácilmente (Dhakar & Geetanjali, 2022). Por ello, ha sido posible detectarlo en muestras de agua con las mismas metodologías comúnmente utilizadas para otros virus entéricos de ARN; es decir, con concentración viral seguida de RT-PCR o RT-qPCR (Kitajima, Sassi & Torrey, 2018). En el panorama del SARS-CoV-2, ha sido empleado como un agente para controlar la variabilidad de muestra a muestra dada por la dilución o el procesamiento de aguas residuales.

Estudios muy semejantes al anterior, con el uso de la misma técnica de concentración, fueron llevados a cabo por Kumar *et al.* (2020) y D'Aoust *et al.* (2020). Ambos emplearon polietilenglicol (PEG) y NaCl a prácticamente las mismas concentraciones indicadas de previo. La diferencia principal radica en que las muestras se agitaron a 4 °C a una velocidad constante por alrededor de 12 horas y se centrifugaron para finalmente conservar el sedimento para la

posterior detección del material genético. D'Aoust *et al.* (2020), utilizaron como virus subrogado al virus de la estomatitis vesicular, justificado por las similitudes biofísicas con el SARS-CoV-2, obteniendo un porcentaje de recuperación de alrededor del 9 %. Mencionan que estos resultados concuerdan con estudios anteriores que indican porcentajes de recuperación para este método que van desde <6 % hasta el 57 %; con la salvedad que los virus utilizados eran variables entre los estudios.

De manera similar, La Rosa *et al.* (2020) documentaron que, tras analizar 40 muestras compuestas de aguas residuales en Italia, había circulación del virus desde el 18 de diciembre del 2019, aun cuando el primer caso autóctono fue reportado hasta el 21 de febrero del 2021. En cuanto a la metodología, se centrifugaron 250 ml de muestra para separar el sedimento, el cual se conservó a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó 19,8 ml de dextrano al 22 %, 143,5 ml de PEG 6000 al 29 % y 17,5 ml de NaCl 5 N. La mezcla se dejó reposar durante la noche a 4 °C, tras lo que los virus fueron recuperados del fondo. Este concentrado se volvió a unir al sedimento obtenido después de la centrifugación inicial. Finalmente, se extrajo con cloroformo al 20 % (v/v) para mejorar la purificación y obtener una mayor sensibilidad de detección. Si bien este último paso podría ser considerado como riesgoso para la detección de un virus con membrana como el SARS-CoV-2, en este estudio se demostró que dicho compuesto químico no afecta en el porcentaje de recuperación viral.

Randazzo *et al.* (2020) emplearon para la concentración el método de adsorción-precipitación con hidróxido de aluminio. Para ello, emplearon como virus subrogados un coronavirus porcino (PEDV) y un mengovirus (MgV); obteniéndose recuperaciones promedio de $10 \pm 3,5$ % y $10 \pm 2,1$ % en afluentes, y $3,3 \pm 1,6$ % y $6,2 \pm 1,0$ % en efluentes, respectivamente. Una vez esto validado, la cuantificación de los títulos de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales sin tratar fue de $5,4 \pm 0,2$ log₁₀ copias/L en promedio. Cabe destacar que se detectaron muestras positivas de aguas residuales entre 12 y 16 días antes de que las autoridades españolas informaran los primeros casos.

Wurtzer *et al.* (2020) en Francia lograron evidenciar, al aplicar una ultracentrifugación, la presencia del genoma viral del SARS-CoV-2 en aguas residuales antes de la fase exponencial de la epidemia; sugiriendo que la detección viral anticipa la notificación de casos clínicos. Notaron igualmente que las concentraciones de SARS-CoV-2 en las aguas residuales aumentaron de 10^4 - 10^5 copias/L al comienzo de la epidemia a 10^6 - 10^7 copias/L después de su punto máximo, para luego disminuir un logaritmo al implementar medidas sanitarias más restrictivas. De esta forma, se confirmó que la curva de concentración viral a través del tiempo concordaba con la dinámica de la enfermedad a nivel regional.

Como se ha visto, son variados los métodos de concentración viral empleados y a raíz de ello han surgido estudios que los comparan para determinar aquel que posee el mejor rendimiento. Hasan *et al.* (2021) en su estudio, tras filtrar la muestra, tomaron 50 mL y los concentraron empleando la precipitación con PEG o columnas de ultrafiltración. Este segundo método resultó en recuentos virales más altos (31,7 copias/mL) en comparación con el uso de PEG (2,6 copias/mL) al analizar la misma muestra.

De forma más amplia, Ahmed *et al.* (2020) analizaron la eficacia de siete diferentes métodos de concentración. Como virus subrogado para determinar el porcentaje de recuperación emplearon el virus de la hepatitis murina (MHV). Los métodos A, B y C se basaban en la adsorción-extracción. El método A acidificó la muestra a pH 4 utilizando HCl, el método B no pretrató la muestra, y el método C adicionó previamente $MgCl_2$ a la muestra hasta una concentración final de 25 mM. Para los tres casos, la muestra fue filtrada en membranas con un tamaño de poro de 0,45 μm que fueron luego insertadas en *bead tubes* para la extracción de ARN. Los métodos D y E se basaban en la ultrafiltración. El F era el que se basaba en la precipitación con PEG. Para este, se centrifugó la muestra a 10000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante inicial se almacenó para combinarse luego con el sobrenadante resultante de un nuevo lavado del sedimento. A este conjunto, se le añadieron PEG 8000 y NaCl en proporciones de 10 % y 2 % p/v, respectivamente. Esta mezcla se agitó a 4 °C durante 2 h a 120 rpm. Después se centrifugó a 10000 g durante 30 min a 4 °C para obtener un sedimento, el cual se resuspendió para proceder con la extracción de ARN. Finalmente, el método G consistía en un paso de ultracentrifugación a 100000 g (Ahmed *et al.*, 2020).

Las principales conclusiones que se obtuvieron de este estudio es que el mejor rendimiento se obtuvo con el método C al emplear membranas electronegativas y $MgCl_2$ ($65.7 \pm 23.0\%$), mientras que el ajuste del pH a 4 llevado a cabo en el método A tuvo una de las peores recuperaciones ($26.7 \pm 15.3\%$). Además, en contraparte, la precipitación con PEG proporcionó recuperaciones aceptables ($44,0 \pm 27,7\%$) (Ahmed *et al.*, 2020).

Así como hay diversos métodos de concentración, son múltiples los kits de extracción del material genético del virus; sin embargo, con cuál se cuenta se asocia más a cada laboratorio y pocas variaciones pueden llevarse a cabo en este ámbito. De manera similar, si bien lo más usual es que se realice una RT-qPCR, son múltiples las técnicas que se pueden emplear (*loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *droplet digital PCR* (ddPCR), secuenciación e incluso CRISPR–Cas12) (Malekshahi *et al.*, 2022) e incluso son muchas las combinaciones de los blancos hacia los cuales se dirigen los *primers* de cada kit comercial (Carter *et al.*, 2020).

Respecto a esta técnica de RT-qPCR, es bien conocido que es un método sensible y preciso, y ha sido catalogado como el estándar de oro para la detección del SARS-CoV-2 (Dutta *et al.*, 2022). La técnica de PCR por sí sola posee la ventaja de generar millones de copias de la secuencia blanco de ADN a partir de una única copia. Sin embargo, para ello requiere el uso de *primers* que hibriden específicamente con las secuencias diana del material genético viral. Como su nombre lo indica la RT-qPCR (*Reverse transcription-quantitative real-time PCR*) requiere una primera conversión de ARN a ADN copia (ADNc) por la acción de la ADN polimerasa ARN dependiente (transcriptasa reversa) (Carter *et al.*, 2020); posteriormente, se desarrolla la amplificación del ADN. Para la determinación estimada del número de copias se emplea una sonda fluorescente que se intercala en los nuevos fragmentos de ADN generados, lo que se traduce en un incremento en la intensidad de fluorescencia; entre mayor sea esta fluorescencia, mayor es la concentración viral inicial de la muestra.

Este proceso puede ser llevado a cabo en un solo paso o en dos pasos. En la metodología de dos pasos o *two steps*, las reacciones para la síntesis de ADNc y la amplificación del ADN se realizan por separado en dos pasos secuenciales. En contraparte, la RT-qPCR de un paso o *one step*, tanto la síntesis de ADNc como las reacciones de amplificación del ADN ocurren simultáneamente dentro de un único tubo (Dutta *et al.*, 2022). Ha sido un punto de discusión el determinar si es mejor emplear la metodología *one step* o *two steps*. Cada una de ellas posee ventajas sobre la otra. Se ha mencionado que la RT-qPCR de dos pasos ofrece mayor flexibilidad y la opción de conservar el ADNc en congelación para futuros análisis. Por su parte, el procedimiento de un solo paso es generalmente el enfoque preferido para la detección de SARS-CoV-2 porque es rápido e implica un manejo limitado de la muestra, lo que reduce las posibilidades de errores de pipeteo y contaminación cruzada entre la retrotranscripción y la amplificación del ADNc (Carter *et al.*, 2020). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Malekshahi *et al.* (2022), se determinó que el poder de detección del método de un solo paso fue un 2,5 % más alto que el del método de dos pasos; siendo una diferencia no significativa. Por ello, indistintamente de la metodología que se realice, se va a cumplir con el propósito de la detección viral de una manera semejante.

En Costa Rica, el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA), logró determinar la presencia del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales. Dentro de este, el Laboratorio Nacional de Aguas (LNA) a partir de mayo de 2020, inició en forma sistemática el programa de muestreo a nivel nacional con la intención de emitir alertas tempranas sobre la aparición de nuevos brotes de COVID-19. Para ese mismo mes, se logró realizar la primera detección de partículas de SARS-CoV-2 en aguas residuales del Centro de Aprehensión

Temporal para Extranjeros en Condición Irregular (CATECI). Conforme aumentó el número de casos activos por COVID-19 en el CATECI, fue aumentando la concentración del virus en las aguas residuales, lo cual, permitió evaluar indirectamente la técnica como un valioso apoyo al seguimiento epidemiológico de los casos en una comunidad dada. Al igual que en este centro, en otros sitios como Limón, Pavas, Desamparados, San José y Golfito, se obtuvieron resultados positivos para este virus (Badilla-Aguilar *et al.*, 2020).

Por último, cabe enfatizar que en esta pandemia el número total de casos infectados registrados y de fallecimientos aumentó al punto de afectar gravemente a la salud pública y a la economía mundial (Ali *et al.*, 2020). En décadas posteriores se espera que surjan nuevas pandemias como esta que sigue en curso; de ahí la importancia de contar con esta metodología para el monitoreo viral, pues la detección temprana del ARN de virus como el SARS-CoV-2 en aguas residuales puede alertar sobre el peligro inminente, dando un tiempo valioso a los actores en el ámbito salud para coordinar e implementar acciones para frenar la propagación de la enfermedad.

Metodología

a) Muestreo

Las muestras fueron recolectadas semanalmente de una planta de tratamiento de aguas residuales en San José, Costa Rica (PTAR-SJ) entre los meses de junio y octubre del 2022, englobando el desde la semana epidemiológica 25 hasta la semana epidemiológica 43. Para ello, se realizó un muestreo compuesto ajustado por la tasa de flujo, en donde las submuestras fueron tomadas cada hora hasta cumplir un tiempo de 24 horas; tras esto, la composición final fue llevada a cabo en el laboratorio. Las muestras se obtuvieron tanto de afluentes como de efluentes de la planta y fueron colectadas en recipientes estériles que se transportaron de la PTAR al laboratorio a 4°C para ser procesadas a la mayor prontitud para evitar la degradación de material genético viral.

b) Concentración

Cada muestra se inoculó con una concentración conocida (10^6 TCID₅₀ por 100 ml de muestra) del virus subrogado BCoV-UNA, el cual es la cepa SMITH cultivada en la línea celular HRT-18, obtenida como donación de la Universidad Nacional (UNA) de Costa Rica. Para probar la mejor tasa de recuperación de SARS-COV-2, se probaron tres protocolos de concentración diferentes:

Método A.

Posterior a la inoculación de la muestra con BCoV, se filtraron 100 mL de la muestra en un sistema de filtración al vacío (Sartorius®, Alemania) empleando un prefiltro de fibra de vidrio (80 µm, 13400-47-Q, Sartorius®, Alemania) tratado con 5,00 mL de extracto de carne 1.5% (Oxoid®, Reino Unido), pH 7,3 por 5 minutos. El volumen completo obtenido se filtró nuevamente utilizando una membrana de nitrato de celulosa de 1,2 µm (11303-47--N, Sartorius®) incubada previamente con 5,00 mL de extracto de carne 1.5% (Oxoid®, Reino Unido), pH 7,3 por 5 minutos. Al filtrado resultante se le ajustó el pH a 3,5-4,0 empleando HCl y se le agregó MgCl₂·7H₂O hasta alcanzar una concentración final de 25 o 250 mmol/L. Ajustadas estas condiciones, el preparado se filtró nuevamente usando una membrana de nitrato de celulosa de 0,22 µm y de 47 mm de diámetro (11327-47--N, Sartorius®, Alemania). Sin remover la membrana, se hizo un lavado del sistema y, sobre el mismo filtro, se añadieron 10,00 mL de extracto de carne 3%, pH 9 por 5 minutos. Este eluido se recuperó a través de una última filtración. Finalmente, a este volumen se le agregó PEG-8000 (Sigma-Aldrich, Estados

Unidos) a una concentración de 8% m/v y 0,2 M de NaCl (Fermont, México) y se agitó vigorosamente. Esta mezcla se incubó en el transcurso de la noche a 4 °C para luego centrifugarse a 3220 g a 4 °C por 90 minutos (Eppendorf 5810R). Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en 1 mL de PBS para la posterior extracción de ARN con el kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen™, Estados Unidos).

Método B.

La muestra fue procesada como se describió para el método A con la variación de que para la extracción de ARN el kit Zymo Environ Water RNA kit (Zymo Research, Estados Unidos) fue el utilizado.

Método C.

Posterior a la inoculación de la muestra con BCoV, se filtró todo el volumen en un sistema de filtración al vacío (Sartorius®, Alemania) empleando un prefiltro de fibra de vidrio (80 µm, 13400-47-Q, Sartorius®, Alemania) tratado con 5,00 mL de extracto de carne 1.5% (Oxoid®, Reino Unido), pH 7,3 por 5 minutos. Posterior a este paso, a diferencia del método A, se agregó PEG-8000 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a una concentración de 8% m/v y 0,2 M de NaCl (Fermont, México) y se agitó vigorosamente. Esta mezcla se incubó en el transcurso de la noche a 4 °C para luego centrifugarse a 3220 g a 4 °C por 90 minutos. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en 1 mL de PBS para la posterior extracción de ARN con el kit Zymo Environ Water RNA kit (Zymo Research, Estados Unidos).

c) Extracción de ARN

El método A, que empleó el PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen™, Estados Unidos) utiliza un volumen de muestra de final 200 µl. Para el proceso completo de extracción se apegó a las instrucciones brindadas por el fabricante, aplicando un volumen de elución final de 15 µl.

Para los métodos B y C se usó el Zymo Environ Water RNA kit (Zymo Research, Estados Unidos), Para el proceso completo de extracción se apegó a las instrucciones recomendadas por el fabricante, aplicando un volumen de elución final de 15 µl.

d) Retrotranscripción

Inmediatamente posterior a la extracción de ARN, todas las muestras fueron retrotranscritas empleando 10 µL de ARN viral y el kit SuperScript™ IV FirstStrand Synthesis System (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos). Paralelamente, empleando el mismo procedimiento, se realizó un control de retrotranscripción utilizando agua libre de nucleasas como plantilla. El protocolo fue realizado de forma que como volumen final de ADNc se obtuvieran 20 µL.

e) qPCR

Se realizó la cuantificación absoluta de BCoV, PMMoV y SARS-CoV-2 mediante qPCR. Para SARS-CoV-2 se utilizó como blanco el gen N1 empleando el kit IDT® nCoV-19 RUO Kit (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos), en conjunto con el TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos). En este caso, como control positivo se utilizó el SARS-CoV-2 2019-nCoV_N (IDT®, Estados Unidos) con un rango de 10^6 hasta 10^1 copias/reacción.

Para BCoV y PMMoV se utilizó el TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos). En ambos para el protocolo se empleó una concentración final de 600 nM para primers y 200 nM para sonda. El volumen de reacción final fue de 25 µL, en los cuales se incluyen los 5 µL de ADNc utilizado. Finalmente, para la curva de calibración se utilizó un gBlock® (IDT®, Estados Unidos) con un rango de 10^6 hasta 10^1 copias/reacción. Igualmente, para ambos, utilizaron como controles positivos una secuencia en particular de cada virus insertada en gBlocks a una concentración de $1 \times 10^9 / 5 \mu\text{L}$ (IDT®, USA).

Todas las secuencias de *primers* y sondas, así como condiciones de amplificación específicas para cada uno de los tres virus se observan en la Tabla 1. Además, todos los análisis de las qPCR fueron realizados en el StepOne™ Plus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos); recalando que para cada muestra se realizó la amplificación individualmente para cada uno de los genes blanco de cada virus.

Tabla 1: *Primers*, sondas y condiciones de amplificación para la detección de SARS-CoV-2, BCoV y PMMoV por qPCR.

Virus	Gen blanco	Secuencia de primers	Condiciones de amplificación
SARS-CoV-2	Proteína N	2019-nCoV_N1-F 5' GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT 3.' 2019-nCoV_N1-R 5' TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG 3.' 2019-nCoV_N1-P 5' FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1 3.'	95 °C, 10 m 45 ciclos: 95 °C 3 s 60 °C 30 s
BCoV	Proteína M	BCoV-F 5'-CTGGAAGTTGGTGGAGTT-3' BCoV-R 5'ATTATCGGCCTAACATACATC-3' BCoV-P 5'-FAM- CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT- QSY-3'	95 °C 2 m 45 ciclos: 95 °C 1 s 60 °C 20 s
PMMoV	Replicasa	PMMV-FP1-rev 5' GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA 3' PMMV-RP1 5' TTGTCGGTTGCAATGCAAGT 3' PMMV-Probe1 5' FAM- CCTACCGAAGCAAATG-MGB-NFQ 3'	95 °C 10 m 45 ciclos: 95 °C 15 s 60 °C 60 s

Tras su análisis, se seleccionaron para ser reportadas únicamente aquellas curvas de calibración con $r^2 > 0.99$ y eficiencias entre 80 y 120%. Además, se optó por que todas las muestras por debajo del límite de detección (10 copias/reacción) fueron reportadas como no detectable.

f) Cálculo del porcentaje de recuperación obtenido

El cálculo del porcentaje de recuperación se realiza con base en las concentraciones del virus subrogado BCoV. Para ello, se analizó cuánto del total del virus inoculado (10^6 TCID₅₀) fue recuperado tras todos los pasos de la metodología. De forma que lo que se usó fue la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\text{BCoV recuperado}}{\text{BCoV inoculado}} \times 100$$

g) Cálculo de la carga viral de la muestra

Para el cálculo de la carga viral de la muestra se requiere realizar una regresión lineal a partir de soluciones con una concentración de copias del virus conocida. De forma que una vez realizada se obtiene una ecuación de la forma:

$$Ct = m(Cn_{\text{viral}}) + b$$

En esta, Ct corresponde al *cycle threshold*, “m” a la pendiente de la curva, Cn_{viral} a la concentración propia del virus en copias/reacción y “b” al intercepto. Con esto hecho, y tras obtener el Ct de la muestra a partir de la qPCR, se sustituye dicho valor en la ecuación anterior para calcular así la concentración. Sin embargo, se puede notar que las cargas virales de la muestra, para este estudio, se reportan en copias/L. Para obtener lo anterior se debe corregir de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Copias}}{\text{L}} = \frac{\text{Copias}}{\text{Reacción}} \times \frac{20 \mu\text{L}}{5 \mu\text{L}} \times \frac{15 \mu\text{L}}{10 \mu\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{0.1\text{L}}$$

A grandes rasgos, se debe ir multiplicando las copias por reacción por una serie de factores de dilución. El primer factor surge a raíz de que de los 20 μL de ADNc únicamente se emplearon 5 μL . El siguiente nace de que de 15 μL del eluido, solo 10 μL se utilizan en la retrotranscripción. El último, por su parte, se utiliza para convertir los 0.1 L (100 mL) de muestra a un volumen de 1 L.

h) Análisis estadístico comparativo

Para determinar la significancia de la diferencia entre dos condiciones se empleó una *t* de *student*; para lo cual se utilizó el programa de Excel (Microsoft 365).

Resultados

Metodologías de concentración y extracción disponibles

Como bien fue posible notar en la sección de marco teórico, a través de los diferentes estudios expuestos la metodología de concentración y extracción eran variables entre ellos. Para recapitular, a grandes rasgos los métodos de concentración pueden agruparse en aquellos que emplean filtración en membranas electronegativas con acidificación previa, ultrafiltración, floculación/precipitación y ultracentrifugación.

En el caso de la filtración a través de membranas electronegativas, se requiere una acidificación previa de la muestra de agua residual para así lograr retener las cápsidas virales electronegativas y eluir las posteriormente. En contraparte, existen también filtros electropositivos, en cuyo caso no se requiere un procesamiento previo de la muestra. Para la ultrafiltración, cuyo principio se basa en la retención de virus debido a su tamaño y no en fuerzas electrostáticas, requiere de sistemas especializados y no filtros convencionales para adsorber el virus. En la precipitación/floculación, a través del uso de compuestos como el polietilenglicol, la leche en polvo u otros, busca la sedimentación de las partículas virales tras un paso de centrifugación. Por su parte, la ultracentrifugación emplea equipos que alcanzan altas revoluciones con el fin de poder remover partículas ajenas al virus.

Considerando los recursos disponibles para la ejecución del proyecto, no es posible validar cada una de las diferentes metodologías descritas en la literatura empleadas para la recuperación del virus SARS-CoV-2. Teniendo en cuenta los equipos y los reactivos químicos disponibles, se optó por utilizar un procesamiento que combinaba el uso de la filtración a través de una membrana electronegativa y la precipitación. Lo anterior tuvo como razón que no se contaba con una ultracentrífuga, sistemas de ultrafiltración ni membranas electropositivas. Al final, con los sistemas de filtración, las sales y demás reactivos, se logró crear una metodología que conjuntaba la adsorción y elución con $MgCl_2$, y la precipitación con PEG. Esto se realizó bajo la premisa de que el uso de ambos culminaría con una mejor recuperación viral.

Estandarización de la metodología

En los primeros ensayos se probó la influencia de diferentes variables como el tiempo de incubación, la concentración de NaCl, la concentración de PEG y la concentración de $MgCl_2$. Sin embargo, el único cambio observable se obtuvo al variar la concentración de $MgCl_2$. Para ello, como se observa en la figura 1, se calculó el porcentaje de recuperación viral al agregar $MgCl_2$ a una concentración final de 25 mmol/L y 250 mmol/L a una misma muestra.

Bajo esta metodología se observó que al emplear una concentración de 250 mmol/L se logró una mejor recuperación ($0.48\% \pm 0.24\%$) en comparación con el uso de 25 mmol/L ($0.06\% \pm 0.04\%$). Sin embargo, al aplicar una *t* de *student* se obtuvo una $p > 0.05$; por lo que no es una diferencia estadísticamente significativa.

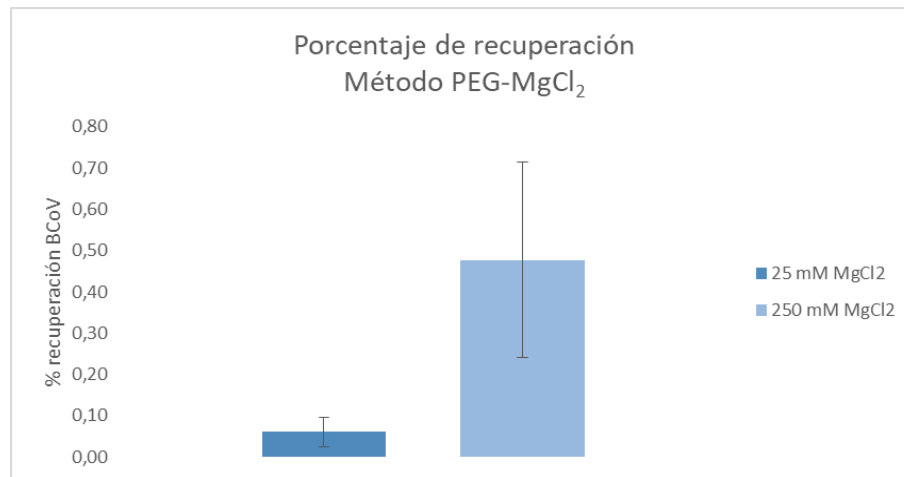


Figura 1. Porcentaje de recuperación viral a diferentes concentraciones de MgCl₂.

En los primeros ensayos realizados se obtuvo una pobre recuperación del virus, de forma que se consideró la presencia de inhibidores de la reacción de PCR como la posible causa de estos resultados. Para dilucidar si esta era la razón, se realizaron diluciones decimales del eluido obtenido de la extracción de ARN; sin embargo, no se encontró una mejora en los resultados.

Hasta ese momento, los ensayos se realizaban empleando como kit de extracción de ARN viral el PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen™, Estados Unidos); sin embargo, para este punto, fue posible la utilización de un nuevo kit de extracción, el Zymo Environ Water RNA kit (Zymo Research, Estados Unidos), Con este, se continuó empleando el mismo procedimiento de PEG-MgCl₂ y, además, se optó por realizar la extracción únicamente utilizando la concentración con PEG, como también ha sido llevado a cabo en la literatura. La figura 2 permite resumir los resultados de recuperación obtenidos para el BCoV. En ella se observa que, al emplear el Zymo Environ Water RNA kit, el porcentaje de recuperación al concentrar únicamente con PEG ($6.06\% \pm 1.38\%$) es mayor que al usar la metodología PEG-MgCl₂; para ambos, se trabajó con un total de 10 muestras. Además, se evidenció que la recuperación más baja se obtuvo con el protocolo PEG-MgCl₂ al utilizarlo en combinación con el PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit ($0.48\% \pm 0.23\%$); esto tras trabajar con un total de 4 réplicas.

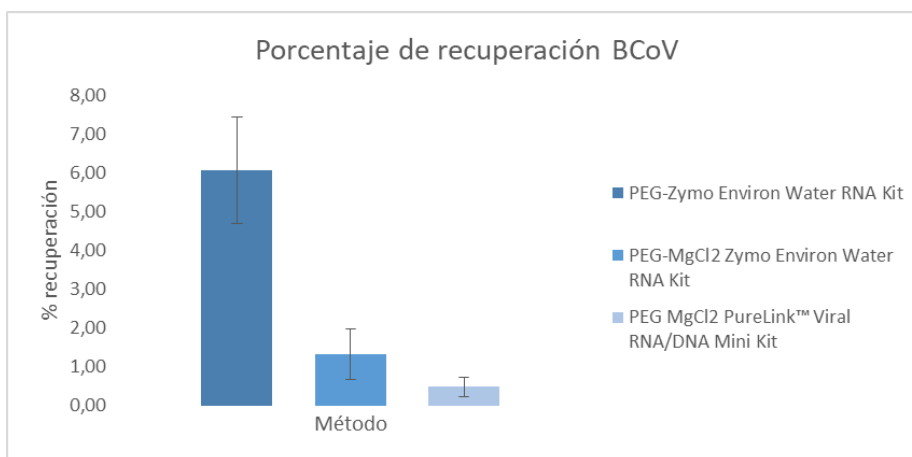


Figura 2. Porcentaje de recuperación del virus subrogado, BCoV, utilizando diferentes métodos de concentración y extracción de ARN.

Estimación de la carga viral de SARS-CoV-2

Debido a estos resultados, se optó por utilizar la metodología PEG-Zymo Environ Water RNA kit. Posteriormente, se procedió a detectar y cuantificar al SARS-CoV-2 y al PMMoV en las muestras tomadas durante el año 2022. Como se observa en la figura 3, se estimó la carga viral para ambos virus desde la semana epidemiológica 25 hasta la semana 43 del año 2022; procesándose en este periodo un total de 34 muestras, donde 20 de ellas eran de afluentes y 14 provenían de efluentes. De manera general, es posible notar que la carga del PMMoV es aproximadamente 2 logs más alta que la de SARS-CoV-2.

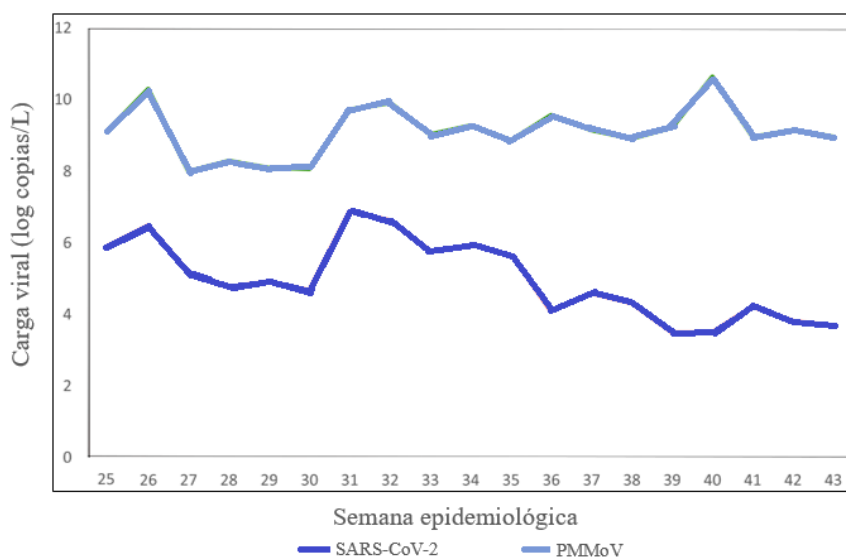


Figura 3. Detección y cuantificación del SARS-CoV-2 y PMMoV en muestras de agua residual.

Además, a partir de la semana 36 y hasta la semana 43, el SARS-CoV-2 recuperado de las muestras disminuyó al punto de ser no cuantificable. Entre este periodo, 5 muestras fueron no detectables (se encontraban por debajo del límite de detección del método de \log_{10} 3.5) y 13 fueron catalogadas como positivas no cuantificables (se encontraban por debajo del límite de cuantificación del método de \log_{10} 4.5). De forma que únicamente fue posible cuantificar al virus SARS-CoV-2 en 16 de las 34 muestras procesadas. Entre las muestras que provenían del afluente y que eran cuantificables, se obtuvo un promedio de \log_{10} 5.71 copias/L de SARS-CoV-2 con una desviación estándar de \log_{10} 0.76. Por otra parte, respecto al efluente, el número promedio de copias/L fue de \log_{10} 6.12 con una desviación estándar de \log_{10} 0.52. Lo anterior se resume en la tabla 2.

Tabla 2: Carga viral del SARS-CoV-2 en el afluente y efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales en San José, Costa Rica.

Condición de la muestra	Afluente	Efluente	Total
Muestras positivas para SARS-CoV-2 (cuantificables)	11	5	16
Promedio (Desviación Estándar)	5.71(0.76)	6.12(0.52)	
No detectable	3	2	5
Muestras positivas para SARS-CoV-2 (no cuantificables)	6	7	13
Total	20	14	34

Discusión

Gracias a la herramienta de epidemiología basada en aguas residuales, y tras lograr una adecuada estandarización de la metodología, fue posible cuantificar el número de copias/L del material genético del virus SARS-CoV-2 en la PTAR-SJ. Tradicionalmente, la progresión de una epidemia, como la del COVID-19, se ha basado en la evaluación de pacientes sintomáticos y en el recuento de pruebas positivas a lo largo del tiempo. Sin embargo, este es un indicador que no abarca la totalidad de infectados y que se ve rezagado por un diagnóstico. Normalmente, la realización de una prueba se asocia en gran medida por la presencia de síntomas, que pueden tardar varios días en presentarse aun cuando ya se esté excretando el virus (Peccia *et al.*, 2020). En el caso del monitoreo de aguas residuales, estos dos factores pierden relevancia. Los resultados de la EAR incluyen casos asintomáticos, información epidemiológica en tiempo real y a un buen costo-beneficio. Esto último adquiere más importancia en países cuyas capacidades diagnósticas no permiten la realización de pruebas masivas. Con la EAR, el muestreo es representativo de una comunidad, lo que permitiría identificar cambios críticos del estado de infección sin sesgo de selección, y al mismo tiempo que se ahorran recursos (Alygizakis *et al.*, 2021). Por ello es que, en un caso de un virus emergente, como el SARS-CoV-2, y en un país como Costa Rica, aplicar este análisis poblacional es muy útil.

En contraparte, debe mencionarse que la EAR igualmente presenta ciertas limitaciones que son intrínsecas a esta herramienta y que no pueden obviarse. Por ejemplo, no todos los pacientes con COVID-19 excretan el ARN del SARS-CoV-2 en las heces y, cuando ocurre, los títulos y la duración de la excreción varían entre individuos y a lo largo del tiempo (Randazzo *et al.*, 2020). Esto podría distorsionar y falsamente disminuir la prevalencia real de la infección; por lo que el análisis de los resultados obtenidos debe hacerse de una manera muy minuciosa. Esto se ve agravado con el hecho de que, como se mencionó, en la población costarricense los síntomas digestivos están presentes, pero a una baja frecuencia. Por ello, podría suponerse que, conociendo que la excreción es mayor en personas que cursan con este tipo de sintomatología, el nivel del virus en aguas residuales sea menor para el país. Sin embargo, esto no es una limitante, pues el número de copias/L es comparable con el de otros estudios presentados anteriormente.

En lo que compete al objetivo principal de esta investigación, primeramente, cabe mencionar que una estandarización de un método para la recuperación viral se ve sujeta a la influencia de múltiples factores, tanto propios del virus como ambientales. Por ejemplo, es de conocimiento que las aguas residuales que ingresan a plantas de tratamiento, se caracterizan

por poseer una amplia variedad de componentes biológicos y químicos que pueden conllevar a una baja recuperación o incluso a la no detección del virus. Esto ocurre como consecuencia de que dichos compuestos pueden causar la degradación directa de la partícula viral y de su material genético, tanto en el ambiente como en el procesamiento de las muestras en el laboratorio (Kumblathan et al., 2022). Mas estos no pueden ser los únicos causantes de un descenso en la recuperación; se ha descrito que factores como la temperatura, el pH y la salinidad pueden influir en la supervivencia del virus en el agua. Incluso se ha descrito que la cantidad de sólidos en suspensión pueden influir en la persistencia de los virus en el agua debido a que una mayor concentración de los mismos protege a las partículas virales de la inactivación (Basavaraju *et al.*, 2021). De forma que, si bien estos factores no fueron contemplados al momento de la realización de este estudio, ciertamente sí tuvieron influencia en los resultados del mismo.

De la misma forma, condiciones propias de la planta de tratamiento como el caudal y el volumen total de agua residual expulsada pueden también interferir en los resultados. Muestras tomadas en un único momento, pueden verse más afectadas por variaciones en estos parámetros. Para reducir esta influencia y tener una muestra más representativa, se prefiere el muestreo compuesto (Alygizakis *et al.*, 2021). En esta modalidad, que fue la utilizada en este estudio, las muestras se recolectan a lo largo del tiempo, ya sea mediante un muestreo continuo o mezclando una serie de alícuotas recolectadas en intervalos de minutos u horas específicas. Con ello se obtiene una muestra que representa el promedio de las diferentes características de las aguas residuales en ese periodo en particular.

En esta línea, se menciona en la literatura que muestras de aguas residuales, en donde la materia fecal se ve diluida por grandes volúmenes de agua, la presencia y, por ende, la recuperación del virus puede ser de baja a moderada aun cuando se procesen varios litros de muestra (Bofill-Mas & Rusiñol, 2020). De forma que un volumen bajo de muestra puede conducir a resultados falsos negativos; por consiguiente, un mayor volumen puede producir señales incluso si la recuperación es baja (Basavaraju *et al.*, 2021). En este caso, solo se emplean 100 mL de muestra, de forma que en caso de fenómenos de dilución podría no ser esperable obtener un número total de copias muy elevado. Lo anterior empeora por el hecho de que un porcentaje alto de partículas virales presentes se pierden durante la concentración, independiente de la metodología que se emplee (filtración en membranas electronegativas con acidificación previa, ultrafiltración, floculación/precipitación y ultracentrifugación).

Antes de incursionar propiamente en la metodología empleada, algunos autores realizan un procedimiento extra de pasteurización con el fin de aumentar la bioseguridad asociada al

manejo de la muestra. Se ha descrito que un tratamiento a 60 °C por 90 min no daña el material genético del virus significativamente y no altera la recuperación del mismo aun cuando este sea almacenado posteriormente. Esto cobra relevancia más en un caso como este, en donde no se han podido excluir rutas de transmisión viral como la fecal-oral. Este paso debería ser el primero en realizarse, y en caso de que luego no pueda procesarse inmediatamente la muestra podría almacenarse a 4 °C. Si bien, se intentó que la concentración viral fuese llevada a cabo justo después que la muestra llegaba al laboratorio, en ocasiones fue refrigerada por pocas horas. Sin embargo, se ha descrito que las muestras de aguas residuales, incluso ya pasteurizadas, se pueden almacenar a 4 °C durante más de una semana (de 9 a 15 días) sin una degradación significativa del ARN viral (Wu *et al.* 2020). Es recomendable por ende, utilizar este procedimiento dentro del algoritmo de procesamiento de muestras.

Obtener un alto porcentaje de recuperación viral de las muestras es un paso crucial y uno de los desafíos más importantes para detectar cualquier patógeno. Para lograrlo, se requiere que todo el proceso, desde la concentración hasta la cuantificación por métodos moleculares, sea llevado a cabo de manera correcta. Particularmente, el paso de concentración viral juega un papel trascendental en lograr este objetivo. En este punto, cabe mencionar que los métodos de concentración utilizados en los diferentes estudios presentados anteriormente se desarrollaron en primera instancia para la detección de virus entéricos sin envoltura, como adenovirus, norovirus y enterovirus (Ahmed *et al.*, 2020). Previo al SARS-CoV-2, poca era la evidencia científica en cuanto a las eficiencias de la recuperación de virus envueltos. Los virus no envueltos son más estables a las condiciones ambientales, pues la membrana de los virus envueltos hace que sean más sensibles a la degradación. Dicho esto, los rendimientos de la concentración de virus del SARS-CoV-2 pueden ser diferentes de las de los virus entéricos sin envoltura debido a las diferencias estructurales significativas que se presentan entre ellos (Twigg & Wenk, 2022).

Para reforzar este concepto, en el estudio llevado a cabo por Saguti *et al.* (2021), se compararon dos metodologías para concentrar partículas virales: una técnica por precipitación y la ultracentrifugación. Si bien se evidenció que para el caso del SARS-CoV-2, la recuperación por precipitación es hasta 50 veces menor, para otros virus no ocurre así. Fue prácticamente igual de sensible para virus de transmisión fecal como norovirus, sapovirus, astrovirus y adenovirus, y más sensible para la detección de rotavirus. Por ello es que para virus emergentes se deben probar diferentes metodologías de concentración, ya que es difícil predecir cuál será la mejor recuperación y cómo será la interacción de los virus frente a los diferentes protocolos.

Inicialmente, como parte de la metodología se consideró un paso de pre-centrifugación, con el objetivo de eliminar las partículas más grandes. Sin embargo, se ha evidenciado que al realizar este proceso se reduce la recuperación a medida que el sedimento absorbe el material genético (Basavaraju *et al.*, 2021). De hecho, estudios previos han sugerido que parte de los virus, como los coronavirus, pueden embeberse dentro de la materia orgánica que contiene la muestra (Ahmed *et al.*, 2020). Por ello, para evitar la pérdida de virus retenidos en residuos sólidos es que se debe omitir este paso.

Por otra parte, es relevante destacar la importancia de los virus subrogados. Estos funcionan como controles externos utilizados ampliamente para controlar, valga la redundancia, la totalidad del proceso. Con ello se busca determinar la eficiencia de la concentración, extracción y amplificación de la PCR. El virus que vaya a funcionar como este tipo de control debe poseer características estructurales y morfológicas similares al virus principal, para así extrapolar el comportamiento del virus en cuestión. Son múltiples los virus subrogados que pueden ser utilizados y, por las características propias que poseen, difieren en la forma en que interactúan con los componentes de las aguas residuales. De forma que, considerando que cada estudio emplea virus subrogados y metodologías diferentes, se dificulta hacer comparaciones directas y generalizaciones entre las diferentes investigaciones (D'Aoust *et al.*, 2020). En este caso, fue utilizado el BCoV, un coronavirus bovino, que presenta características biofísicas semejantes con el SARS-CoV-2.

Es así que, a través del uso del BCoV (virus empleado para la estandarización del método), varios aspectos pueden destacarse. Primeramente, como se evidencia en la figura 1, si bien no es una diferencia significativa, la presencia de concentraciones variables de $MgCl_2$, tienen efecto en el porcentaje de recuperación. Es un hecho que cuando se emplea la filtración en membranas electronegativas, se requiere la adición de sales multivalentes a la muestra de agua residual; respecto a ello múltiples hipótesis han surgido para explicar el porqué. Una de ellas es que la presencia de sales crea un “puente salino” que promueve las interacciones electrostáticas entre el filtro y el virus (Ikner, Gerba & Bright, 2012), al mismo tiempo que neutraliza las cargas de la membrana. También, se postula que las mismas sales producen un tipo de floculación, en donde los virus se ven capturados y retenidos físicamente en el proceso de filtrado (Lukasik *et al.*, 2000). Sin embargo, ocurre que por la presencia de materia orgánica, el efecto deseado de estas sales se ve suprimido. Se ha reportado que en el caso del $AlCl_3$, una sal usada para el mismo fin, se requirieron concentraciones más altas para recuperar el virus de agua con restos orgánicos que de agua del grifo (Lukasik *et al.*, 2000). Para nuestro caso, pudo haber ocurrido que el agua residual, al ser una matriz con una carga de materia orgánica

elevada, aun tras dos pasos de filtrado contuviera una concentración elevada de componentes orgánicos que a la postre inhibirían el efecto del $MgCl_2$. Para contrarrestar ello, se necesitaría más sal; siendo una posible razón por la cual al aumentar la cantidad de la misma se obtuvo una mejor recuperación.

Los métodos de concentración viral basados en la precipitación con productos químicos como el PEG, han sido ampliamente utilizados por su bajo costo y facilidad de uso. Sin embargo, el uso de PEG, a manera general, se ha asociado a rendimientos relativamente bajos y a una mayor concentración de inhibidores de PCR (Basavaraju *et al.*, 2021; Ahmed *et al.*, 2020). Es interesante entonces que en esta investigación, tal como se observa en la figura 2, el empleo únicamente de la concentración con PEG brinde una mayor recuperación al compararlo con el uso de este junto con el $MgCl_2$.

En el estudio llevado a cabo por Ahmed *et al.* (2020) se evidencia que el paso de acidificación de la muestra a pH 4 es contraproducente; ya que al igual que en nuestro caso, la recuperación al acidificar fue peor que la obtenida con el PEG. Ellos postulan que la acidificación de la muestra podría afectar la integridad del virus; sugiriendo que, a diferencia de otros virus entéricos para los cuales fue estandarizado el método, el SARS-CoV-2 puede ser sensible a un pH bajo, y de ahí el mal rendimiento que se observa. En síntesis, evitar el cambio de pH podría minimizar el daño de la membrana y la cápside.

Además, el protocolo que emplea el $MgCl_2$ conlleva tres rondas de filtración; dos más que solo cuando se utiliza PEG. Es conocido que parte del total de las partículas virales son retenidas en la membrana de filtración, mientras que otra porción se recupera en el filtrado. Por ello, puede ocurrir que la cantidad de virus que se pierde en los procesos de filtración sea mayor cuando más pasos son requeridos. Igualmente, cuando se utiliza $MgCl_2$, se requiere un paso de elución; el cual puede que no logre liberar la totalidad de las partículas virales que se asume se encuentran unidas a la membrana.

En esta investigación, y por las posibles explicaciones brindadas, el mejor porcentaje de recuperación del BCoV fue empleando la precipitación con PEG (6.06%). Estudios que utilizaron este mismo virus, si bien fue con otras metodologías, obtuvieron un rendimiento similar. Uno de ellos fue llevado a cabo por Gonzalez *et al.* (2020) donde se reportó un porcentaje de recuperación de 5.5% usando el InnovaPrep kit y de 4.8% al utilizar la filtración en membranas electronegativas.

Asimismo, como se observa en la figura 2, los kits de extracción también poseen cierta relevancia en cuanto al porcentaje de recuperación que se vaya a obtener. O'Brien *et al.* (2021) se encargó de comparar la eficiencia de 4 kits de extracción: Qiagen All Prep PowerViral

DNA/RNA kit, New England BioLabs Monarch RNA MiniPrep Kit, Zymo Quick RNA-Viral Kit y el Zymo Quick-RNA Fecal/Soil Microbe MicroPrep Kit (conocido también como Zymo Environ Water RNA Kit). Este último, para ese estudio en particular, obtuvo un porcentaje de recuperación del 73% del ARN del SARS-CoV-2, colocándose como el kit más eficaz y eficiente al compararlo con los demás (O'Brien *et al.*, 2021). En este mismo estudio recalcan que la ausencia de un paso de remoción de inhibidores de PCR puede conllevar a una mala amplificación de ácidos nucleicos. Al poseer columnas extras para eliminar estos inhibidores, y porque existe un paso de preservación de ARN, es que mencionan que el Zymo Environ Water RNA Kit brinda los resultados más consistentes y eficientes (O'Brien *et al.*, 2021).

En cuanto a la amplificación final de los ácidos nucleicos del virus, se han descrito diferentes especificidades y sensibilidades debido a los diferentes genes diana que se amplifican, y a los *primers* y sondas específicas que se utilizan en el proceso (Alygizakis *et al.*, 2021). Como bien se mencionó, con el transcurso del tiempo, el material genético del SARS-CoV-2 se degrada en las muestras de aguas residuales, de forma que se recomienda detectar más de un gen para limitar resultados falsos negativos. En esta metodología se amplificó únicamente el gen codificante para la proteína N; por lo que no puede descartarse que haya habido una disminución en los resultados obtenidos por pérdida de esta secuencia genética en particular.

En esta misma línea, puede debatirse el uso de una metodología de amplificación de dos pasos. Sin embargo, como se mencionó en los antecedentes, la diferencia entre el uso de un protocolo *one step* y *two steps* no es tan significativa. Si bien el método de un paso es más rápido y reduce los errores de pipeteo y contaminación cruzada, para este tipo de análisis, que no requiere resultados inmediatos y puede demorarse unas cuantas horas, se podría usar cualquier metodología indistintamente.

En cuanto al uso del PMMoV como control interno, estudios anteriores han demostrado que este es el virus de ARN más abundante en las heces humanas y que se concentra en grandes cantidades en las aguas residuales. Al igual que el SARS-CoV-2, el PMMoV es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, lo que lo hace adecuado como referencia interna para ayudar a controlar la variabilidad de muestra a muestra dada por la dilución o el procesamiento de aguas residuales. De forma que con el uso del PMMoV, se pueden verificar que en períodos de incidencia baja de COVID-19, sea realmente por un descenso de casos, y no asociado con errores en la recolección, transporte, concentración, extracción y análisis las muestras (D'Aoust *et al.*, 2020). Por ello, es que, como se observa en la figura 3, es posible confirmar que los

resultados no detectables o no cuantificables sean verdaderamente por un bajo descenso en la concentración del SARS-CoV-2 en la muestra.

Por ello, es posible realizar una comparación con los datos de números de casos obtenidos por el diagnóstico de laboratorio y reportados por las autoridades de salud. Se ha observado que hay una tendencia igual entre el número de casos de COVID-19 y la concentración de SARS-CoV-2 en aguas residuales. En territorio costarricense, al comparar con los datos epidemiológicos brindados por el Ministerio de Salud en el periodo de los muestreos, se observó que al momento en que se dio la disminución de la carga de SARS-CoV-2, paralelamente se tuvo un descenso en la prevalencia de COVID-19 a nivel nacional.

Para tener un panorama más a nivel nacional, se podría pensar en analizar plantas de tratamiento en diferentes zonas del país para tener un panorama más integrado de la epidemiología nacional. Mas, cabe mencionar que Centeno y Murillo (2019) indican que para el año 2017 los sistemas de recolección de aguas residuales que culminaban con una llegada a una PTAR abarcaban únicamente el 28.5 % de la población urbana y el 5.1 % en zonas rurales. Estos bajos porcentajes imposibilitan que la vigilancia de patógenos pueda ser implementada a nivel de múltiples comunidades al punto que reflejen la situación global del país.

Sin embargo, no se descarta que una vez validada esta metodología, pueda emplearse y ser de utilidad como una herramienta para una toma de decisiones por las autoridades competentes; sabiendo que posee un respaldo de que la información obtenida es resultado de la situación epidemiológica poblacional. Aún más con el hecho de que, como se comentó a través del desarrollo de este estudio, la EAR sí es capaz de predecir el comportamiento de la infección por COVID-19 hasta incluso casi una semana antes del aumento de casos y hospitalizaciones.

Finalmente, cabe informar que el proceso de tratamiento de las aguas residuales por parte de esta planta no es eficiente para remover el material genético viral. Como se indicó, para las muestras cuantificables del afluente se obtuvo una concentración promedio de $\log_{10} 5.71 \pm 0.76$ copias/L de SARS-CoV-2, mientras que para el efluente fue de $\log_{10} 6.12 \pm 0.52$. Ambas concentraciones prácticamente se superponen, por lo que no se está eliminando este tipo de agentes correctamente. Esto concuerda con el hecho de que esta PTAR funciona solo con un tratamiento primario; por lo que a grandes rasgos únicamente elimina sólidos orgánicos suspendidos. Ahmed *et al.* (2020), indicaron en su estudio que para reutilizar el agua proveniente de una PTAR para riego es necesaria una reducción del virus de 6-7 \log_{10} . Con los resultados obtenidos, es notable que en nuestro caso los desechos seguirán depositándose con altas cargas virales a los cuerpos de agua, y sin ningún uso adicional. Si bien, no se ha

documentado el caso de infecciones por COVID-19 a partir de aguas residuales ya tratadas, no se puede descartar como una posible vía de transmisión del virus. Por ello, se fomenta el uso de un mejor tratamiento para reducir la concentración viral del efluente de la PTAR-SJ. Se ha documentado que la remoción del SARS-CoV-2 se potencia con un tratamiento terciario que incluya procesos físico-químicos. En cuanto a las técnicas de desinfección, que pueden ser replicadas en nuestro país, diferentes estudios han obtenido muy buenos resultados al emplear la cloración y la radiación ultravioleta para eliminar los virus de las aguas residuales (Saawarn & Hait, 2021).

Conclusiones

Fue posible estandarizar una metodología de concentración adecuada para la recuperación de virus envueltos, como lo es el SARS-CoV-2, en muestras de aguas residuales provenientes de plantas de tratamiento. Para ello, se respalda el empleo de la metodología de concentración por precipitación con PEG y del uso del kit de extracción Zymo Environ Water RNA kit. Con estos, se logra una forma de obtener resultados comparables con otros alcanzados en diferentes investigaciones internacionales.

En algún escenario donde surja un coronavirus similar u otro virus con características físicas similares, y que sean excretados en heces, se podría optar en realizar esta metodología al esperar un resultado equivalente. Sin embargo, cabe destacar que no para todos los virus emergentes se puede garantizar que esta misma metodología sea la más eficaz. Al igual que para el SARS-CoV-2, se requerirá de un proceso de comparación de variables para ir puliendo el protocolo hasta alcanzar el más óptimo.

Además, se evidencia la utilidad de la EAR como una herramienta plausible para el monitoreo de patógenos como enterovirus, adenovirus, norovirus, rotavirus, astrovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, poliovirus y, más recientemente, SARS-CoV-2. Para ello, el seguimiento del transcurso de una infección, como lo es la COVID-19, puede hacerse a través de la cuantificación del número de copias de ARN viral. Sin embargo, lo anterior debe ir acompañado del análisis de un control interno, como el PMMoV, para brindarle validez a los datos obtenidos.

La EAR se coloca como una forma de determinar la propagación, persistencia y detección del SARS-COV-2. A manera nacional, en un país como Costa Rica, donde el número de pruebas diagnósticas se ve limitado por recursos económicos y donde hay un subregistro a raíz de pacientes asintomáticos o de aquellos sintomáticos que simplemente no asisten para su debido diagnóstico, la detección de patógenos virales en aguas residuales toma mayor importancia. Esta vigilancia, entonces, ofrece ventajas en comparación con las pruebas clínicas de pacientes con COVID-19, ya que este enfoque es rentable, no invasivo y eficiente para proporcionar datos más amplios de la población.

Se espera que la detección temprana del ARN del SARS-CoV-2 en aguas residuales pueda alertar sobre el peligro inminente, dando un tiempo valioso a los gestores para coordinar e implementar acciones para frenar la propagación de la enfermedad al momento que lo consideren necesario.

Recomendaciones

Para optimizar aún más metodología ciertos procesos pueden ser llevados a cabo. Se recomienda el uso de un tratamiento de pasteurización para aumentar la bioseguridad del proceso. Además, se fomenta el empleo de un procedimiento *one step* principalmente para disminuir la contaminación cruzada y los errores de pipeteo asociados a la metodología de dos pasos. Finalmente, se promueve la detección de más que únicamente el gen codificante para la proteína N; agregando *primers* para la amplificación de otras secuencias genéticas del virus, se podrían disminuir el número de falsos positivos.

Al notar que sí es factible recuperar el material genético viral, se fomenta el empleo de otras técnicas como la secuenciación. Se ha evidenciado en diferentes estudios que a través de este método es posible identificar rápidamente la aparición de variantes de SARS-CoV-2 y monitorear su propagación en una comunidad. Además, permitiría detectar mutaciones que pueden afectar la identificación viral en el marco clínico.

Referencias Bibliográficas

- Ahmed, W., Bertsch, P., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B., Mueller, J., Simpson, S., Smith, W., Symonds, E., Thomas, K., Verhagen, R. & Kitajima, M. (2020). Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment*, 739. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>.
- Ahmed, W., Kitajima, M., Tandukar, S. & Haramoto, E. (2020). Recycled water safety: current status of traditional and emerging viral indicators. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 16, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.02.009>.
- Ali, S., Baloch, M., Ahmed, N., Ali, A. & Iqbal, A. (2020). The outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) - An emerging global health threat. *Journal of Infection and Public Health*, 13(4), 644–646. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.02.033>.
- Alygizakis, N., Markou, A. N., Rousis, N. I., Galani, A., Avgeris, M., Adamopoulos, P. G., Scorilas, A., Lianidou, E. S., Paraskevis, D., Tsiodras, S., Tsakris, A., Dimopoulos, M. & Thomaidis, N. S. (2021). Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Protocols and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116125>.
- Amirian, E. S. (2020). Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: current evidence and implications for public health. *International journal of infectious diseases*, 95, 363-370. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.057>.
- Badilla-Aguilar, A., Rivera-Navarro, P., Alfaro-Arrieta, E., Vega-Guzmán, I., Orozco-Gutiérrez, J. & Mora-Alvarado, D. (2020). *Avances en la detección de material genético del SARS-CoV-2 en Aguas Residuales en Costa Rica; 2020* [Archivo PDF]. dspaceaya.igniteonline.la/bitstream/handle/aya/394/AD00256DOC.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Basavaraju, S., Aswathanarayan, J. B., Basavegowda, M & Somanathan, B. (2021). Coronavirus: occurrence, surveillance, and persistence in wastewater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(508). <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09303-8>.
- Bofill-Mas, S. & Rusiñol, M. (2020). Recent trends on methods for the concentration of viruses from water samples. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 16, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.006>.

- Carter, L., Garner, L., Smoot, J., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C., Sasso, J., Gregg, A., Soares, D., Beskid, T., Jervey, S. & Liu, C. (2020). Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Central Science*, 6, 591-605. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>.
- Centeno, E. & Murillo, A. (2019). Tipología de las tecnologías de tratamiento de aguas residuales ordinarias instaladas en Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(2), 97-110. <https://doi.org/10.15359/rca.53-2.5>.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (10 de marzo de 2023). National Wastewater Surveillance System (NWSS). <https://www.cdc.gov/nwss/index.html>.
- Chacón, L., Morales, E., Valiente, C., Reyes, L. & Barrantes, K. (2021). Wastewater-Based Epidemiology of Enteric Viruses and Surveillance of Acute Gastrointestinal Illness Outbreaks in a Resource-Limited Region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(4), 1004-1012. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0050>.
- Chacón-Jiménez, L., Hall-Loría, K., Rivera-Navarro, P. C., Reyes-Lizano, L., Achí-Araya, R. & Barrantes-Jiménez, K. (2022). Circulación de genes de virulencia asociados a *Escherichia coli* diarreogénica en aguas residuales del Gran Área Metropolitana de Costa Rica. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2), 330-354. <http://dx.doi.org/10.15517/psm.v0i19.48037>.
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5, 536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Causanilles, A., Ruepert, C., Ibáñez, M., Emke, E., Hernández, F. & de Voogt, P. (2017). Occurrence and fate of illicit drugs and pharmaceuticals in wastewater from two wastewater treatment plants in Costa Rica. *Science of the Total Environment*, 599, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.202>.
- Cheung, K. S., Hung, I. F., Chan, P. P., Lung, K. C., Tso, E., Liu, R., Ng, Y., Chu, M. Y., Chung, T. W., Raymond, A., Yip, C. C., Leung, K. H., Fung, A., Zhang, R. R., Lin, Y., Cheng, H. M., Zhang, A. J., To, K. K., Chan, K. H., Yuen, K. Y. & Leung, W. K. (2020). Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong cohort: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 159(1), 81-95. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.065>.
- European Commission (17 de marzo de 2022). Coronavirus response: monitoring of wastewater contributes to tracking coronavirus and variants across all EU countries.

https://environment.ec.europa.eu/news/coronavirus-response-monitoring-wastewater-contributes-tracking-coronavirus-and-variants-across-all-2022-03-17_en.

- D'Aoust, P. M., Mercier, E., Montpetit, D., Jia, J. J., Alexandrov, I., Neault, N., Baig, A. T., Mayne, J., Zhang, X., Alain, T., Langlois, M. A., Servos, M. R., MacKenzie, M., Figeys, D., Mackenzie, A. E., Graber, T. E. & Delatolla, R. (2021). Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water research*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116560>.
- Dhakar, V. & Geetanjali, A. S. (2022). Role of pepper mild mottle virus as a tracking tool for fecal pollution in aquatic environments. *Archives of Microbiology*, 204(513). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03121-3>.
- Dutta, D., Naiyer, S., Mansuri, S., Soni, N., Singh, V., Bhat, K., Singh, N., Arora, G. & Mansuri, M. (2022). COVID-19 diagnosis: a comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics*, 12(6), 1503. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061503>.
- El Ouali, S., Achkar, J. P., Lashner, B. & Regueiro, M. (2021). Gastrointestinal manifestations of COVID-19. *Cleveland Clinic journal of medicine*. <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.ccc049>.
- Foladori, P., Cutrupi, F., Segata, N., Manara, S., Pinto, F., Malpei, F., Bruni, L. & La Rosa, G. (2020). SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: what do we know? A review. *Science of the Total Environment*, 743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140444>.
- Gonzalez, R., Curtis, K., Bivins, A., Bibby, K., Weir, M. H., Yetka, K., Thompson, H., Keeling, D., Mitchell, J. & Gonzalez, D. (2020). COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water research*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>.
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in immunology*, 41(12). <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.
- Hasan, S. W., Ibrahim, Y., Daou, M., Kannout, H., Jan, N., Lopes, A., Alfafar, H. & Yousef, A. F. (2021). Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: Surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab Emirates. *Science of The Total Environment*, 764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142929>.

- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nietzsche, A., Müller, M. A., Drosten, C. & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(3), 141-154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- Ikner, L. A., Gerba, C. P. & Bright, K. R. (2012). Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food and Environmental Virology*, *4*, 41-67. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>.
- Keshaviah, A., Diamond, M., Wade, M. & Scarpino, S. (2023). Wastewater monitoring can anchor global disease surveillance systems. *The Lancet Global Health*, *11*(6), 976-981. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00170-5).
- Kitajima, M., Sassi, H. P. & Torrey, J. R. (2018). Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *NPJ Clean Water*, *1*(19). <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>.
- Kumar, M., Patel, A. K., Shah, A. V., Raval, J., Rajpara, N., Joshi, M. & Joshi, C. G. (2020). First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *Science of The Total Environment*, *746*, 141326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141326>.
- Kumblathan, T., Piroddi, N., Hrudey, S. E. & Li, X. F. (2022). Wastewater based surveillance of SARS-CoV-2: challenges and perspective from a Canadian inter-laboratory study. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *116*, 229-232. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.01.039>.
- La Rosa, G., Mancini, P., Bonanno-Ferraro, G., Veneri, C., Iaconelli, M., Bonadonna, L., Lucentini, L. & Suffredini, E. (2021). SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring. *Science of The Total Environment*, *750*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141711>.
- Lukasik, J., Scott, T. M., Andryshak, D. & Farrah, S. R. (2000). Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and environmental microbiology*, *66*(7), 2914-2920. <https://doi.org/10.1128/aem.66.7.2914-2920.2000>.
- Malekshahi, A., Khanizadeh, S., Fallahi, S., Talei, G., Birjandi, M. & Hajizadeh, F. (2022). Diagnostic power of one-step and two-step RT-qPCR methods to SARS-CoV-2

- detection. *BMC Infectious Diseases*, 22(505). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07478-0>.
- Mallapaty, S. (2020). How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. *Nature*, 580(7802), 176-177. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00973-x>.
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. & Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters*, 7, 511-516. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- Molina-Mora, J., González, A., Jiménez-Morgan, S., Cordero-Laurent, E., Brenes, H., Soto-Garita, C., Sequeira-Soto, J. & Duarte-Martínez, F. (2022). Clinical profiles at the time of diagnosis of SARS-CoV-2 infection in Costa Rica during the pre-vaccination period using a machine learning approach. *Phenomics*, 2(5), 312-322. <https://doi.org/10.1007/s43657-022-00058-x>.
- Mukhra, R., Krishan, K. & Kanchan, T. (2020). Possible modes of transmission of novel coronavirus SARS-CoV-2: a review. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 91(3). <https://doi.org/10.23750/abm.v91i3.10039>.
- Noyola, A., Padilla-Rivera, A., Morgan-Sagastume, J. M., Güereca, L. P. & Hernández-Padilla, F. (2012). Typology of Municipal Wastewater Treatment Technologies in Latin America. *Clean - Soil, Air, Water*, 40(9), 926-932. <https://doi.org/10.1002/clen.201100707>.
- O'Brien, M., Rundell, Z. C., Nemeč, M. D., Langan, L. M., Back, J. A. & Lugo, J. N. (2021). A comparison of four commercially available RNA extraction kits for wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in a college population. *Science of The Total Environment*, 801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149595>.
- Organización Mundial de la Salud (05 de mayo de 2023). Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic).
- Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D. A., Grubaugh, N. D., Kaplan, E. H., Casanovas-Massana, A., Ko, A., Malik, A. A., Wang, D., Wang, M., Warren, J. L., Weinberger, D. M. & Omer, S. B. (2020). SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>.

- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A. & Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water research*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>.
- Saguti, F., Magnil, E., Enache, L., Churqui, M. P., Johansson, A., Lumley, D., Davidsson, F., Dotevall, L., Mattsson, A., Trybala, E., Lagging, M., Lindh, M., Gisslén, M., Brezicka, E., Nyström, K. & Norder, H. (2021). Surveillance of wastewater revealed peaks of SARS-CoV-2 preceding those of hospitalized patients with COVID-19. *Water research*, 189. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116620>.
- Saawarn, B. & Hait, S. (2021). Occurrence, fate and removal of SARS-CoV-2 in wastewater: Current knowledge and future perspectives. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104870>.
- Sodhi, K. K. & Singh, C. K. (2022). A systematic review on the occurrence, fate, and remediation of SARS-CoV-2 in wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04326-1>.
- Tang, A. N., Tong, Z. D., Wang, H. L., Dai, Y. X., Li, K. F., Liu, J. N., Wu, W. J., Yuan, C., Yu, M. L., Li, P. & Yan, J. B. (2020). Detection of novel coronavirus by RT-PCR in stool specimen from asymptomatic child, China. *Emerging infectious diseases*, 26(6), 1337-1339. <https://doi.org/10.3201/eid2606.200301>.
- Twigg, C. & Wenk, J. (2022). Review and meta-analysis: SARS-CoV-2 and enveloped virus detection in feces and wastewater. *ChemBioEng Reviews*, 9(2), 129-145. <https://doi.org/10.1002/cben.202100039>.
- Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Liu, Y., Li, X. & Shan, H. (2020). Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*, 158(6), 1831-1833. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>.
- Wu, F., Zhang, J., Xiao, A., Gu, X., Lee, W. L., Armas, F., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvallet, C., Poyet, M., Moniz, K., Washburne, A. D., Erickson, T. B., Chai, P. R., Thompson, J. & Alm, E. J. (2020). SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00614-20>.
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J. M., Maday, Y., Teyssou, R., Richard, E., Almayrac, J. & Moulin, L. (2020). Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.

Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W. L., Hibberd, M. L., Liu, E. T., Rohwer, Y. & Ruan, Y. (2006). RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003>.